



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E  
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE CITRULINA  
EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

Ana Cláudia Vieira

Florianópolis  
2014



Ana Cláudia Vieira

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E  
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE CITRULINA  
EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique  
Reginatto

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Ana Claudia  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE  
CAPILAR PARA ANÁLISE DE CITRULINA / Ana Claudia Vieira ;  
orientador, Flávio Henrique Reginatto - Florianópolis, SC,  
2014.  
108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Desenvolvimento de Métodos. 3.  
Citrulina. 4. CLAE . 5. EC. I. Reginatto, Flávio Henrique.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia. III. Título.

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E  
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE CITRULINA  
EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de Agosto de 2014.

---

Prof.<sup>ª</sup> Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Celso Spada

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Dra. Cristiane Ritter

Universidade do Extremo Sul Catarinense

---

Dra. Izabella Thais da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado a minha  
querida avó Marina.



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, pela confiança ao aceitar me orientar, pela orientação, paciência que exerceu comigo e por todos os conhecimentos repassados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina da qual fui aluna durante o período do mestrado e graduação.

Agradeço à Claudinha, técnica do laboratório, “uma mãezona”, sempre “brigando” comigo para não ficar até tarde e comer. Muito obrigada pelas broncas, comidinhas e incentivo.

Aos meus amigos que me acompanham desde o colégio, Deus nos deu irmãos de sangue e a graça de escolher outros irmãos para seguir juntos na caminhada da vida. As minhas queridas irmãs Juliana, Isís, Bianka, Carla, Janaina, e Luciana.

Aos novos amigos que fiz durante esse período de laboratório e faculdade Chris, Tamires, Tatiana, Maria Izabel, Vitor, Simone, Geison, Carlos, Caroline, Ana, Lara, Fernanda, Layzon, Fernanda (Beira mar), Talitha, Rafael, Gabriele, Karen, Rafaela, Solomon, Andressa, Tauana, Teca, Éverson, Luiz, Viviane, Manoela, Gis, Narjara, Larissa, Francine, Pâmela, Aguisson (desculpem se esqueci de algum nome, são tantas pessoas). Foram ótimos todos os momentos juntos, as conversas, risadas, almoços comunitários ou apenas os almoços durante a greve do RU, trabalhos, ensinamentos (o maior preparar chimarrão e que o capeta existehehe..) e todas as palhaçadas que tivemos ao longo desses anos.

Aos meus pais, Dalmiro e Helena, que sempre se esforçaram para que eu pudesse realizar meus sonhos, agradeço pelas oportunidades de estudo e por toda paciência e compreensão que exerceram comigo ao longo desse tempo, apesar de não terem menor noção do eu faço tentam entender e apoiar as minhas decisões. Aqui é uma pequena demonstração do meu agradecimento ao esforço de vocês.

Aos meus irmãos “Zé” e Ana Paula, todo apoio e incentivo. Aos meus sobrinhos Felipe, Ana Luiza e Ana Sofia, pestinhas amadas.

Meus sinceros agradecimentos a Deus, à minha família, ao meu orientador e a todos outros que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.



“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Carolina)



## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE CITRULINA EM MATRIZES BIOLÓGICAS

A intensa busca por novos biomarcadores de doenças com intuito de melhorar o diagnóstico e acompanhar a evolução da doença tem feito os pesquisadores reavaliar compostos antes ignorados, como a citrulina. Este aminoácido não proteico que faz parte do ciclo da ureia ganhou destaque nos últimos anos como marcador da função intestinal, auxiliando na rejeição ao transplante. A citrulina quando associada com outros marcadores também tem sido utilizada para acompanhar o desenvolvimento de algumas doenças, dentre elas a sepse e falência renal. Apesar de bastante avaliada, não há uma padronização metodológica para análise desse aminoácido, havendo necessidade do desenvolvimento de metodologias que sejam simples, baratas e que possam ser implementadas em exames de rotina. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar metodologias por cromatografia líquida e alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), capazes de identificar e quantificar o aminoácido citrulina em plasma. Foi possível desenvolver métodos para quantificar a citrulina por CLAE e EC sem a utilização de agentes de derivatização. Ambas as metodologias atenderam os parâmetros de precisão, com coeficiente de variação inferior a 4%, e exatidão, respectivamente, de 75 e 95%. A faixa de linearidade obtida apresentou coeficientes de determinação de 0,9905 e 0,996, e limites de detecção de 4,07 e 2,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e quantificação de 12,34 e 6,88  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, para CLAE e EC. A quantificação da citrulina por ambas as técnicas mostrou ser possível, porém, a EC apresentou resultados mais promissores.

**Palavras-chave:** Citrulina, CLAE, EC.



## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS ANALYSIS FOR CITRULLINE IN BIOLOGICAL MATRICES

The intense search for new biomarkers of disease with the aim of improving diagnosis and monitor disease progression has made researchers reevaluate compounds previously ignored, such as citrulline. This non-protein amino acid that is part of the urea cycle has gained prominence in recent years as a marker of intestinal function, aiding in transplant rejection. Citrulline when associated with other markers have also been used to monitor the development of some diseases such as sepsis and renal failure. Despite being fairly analyzed there is no standardization for the analysis of this amino acid, there is need to develop methodologies that are simple, cheap and can be implemented in routine analysis. This study aimed to develop and validate methodologies for HPLC and CE can identify and quantify citrulline in plasma. It was possible to develop methods for quantifying citrulline by HPLC and CE without the use of derivatizing agents. Both methodologies met the precision data with a coefficient of variation less than 4%, the accuracy found was 75 and 95%. The range of linearity obtained exhibited correlation coefficients of 0.9905 and 0.996 and detection limits 4.07 and 2.25  $\mu\text{g/mL}$  and quantification of 12.34 and 6.88  $\text{mg/mL}$ , respectively for HPLC and CE. The quantification of the citrulline showed to be possible by both techniques, but CE was the technique that showed more promising results.

**Keywords:** Citrulline, HPLC, CE.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do aminoácido citrulina.....	31
Figura 2 - Metabolismo da citrulina nos enterócitos.....	32
Figura 3 - Esquema representando as reações envolvidas na síntese de citrulina no enterócito .....	33
Figura 4 - Ciclo da Ureia .....	35
Figura 5 - Síntese de Óxido Nítrico a partir da Arginina .....	36
Figura 6 - Peptidilargininadeiminase (PAD) convertendo ARG em CIT .....	45
Figura 7 - Imagens Micro-CT do calcâneo de animais tratados com CII (Controle negativo) e CIT-CII. A cor azul representa alta densidade óssea, que se perde significativamente no grupo tratado. (b). Aumento de fragmentação óssea representado pelas setas.....	47
Figura 8 - Esquema de realização da técnica ELISA indireto na pesquisa de anti-PCC .....	56
Figura 9 - Esquema de funcionamento da técnica CLAE .....	58
Figura 10 - Ilustração do funcionamento do equipamento da EC .....	60
Figura 11 - Representação esquemática da parede do capilar.....	60
Figura 12 - Esquema adaptado do funcionamento do kit Amicon® Ultra-15.....	67
Figura 13 - Cromatograma da amostra teste tratada com o kit Amicon® Ultra-15 .....	68
Figura 14 - Cromatograma da amostra teste não tratada.....	68
Figura 15 - Reação de dissociação do ácido fosfórico.....	76
Figura 16 - Cromatograma de uma amostra de plasma e substância de referência citrulina, analisadas no comprimento de onda de 207nm. ....	77
Figura 17 - Eletroferograma da amostra de um paciente analisada em 207 nm. 81	
Figura 18 Eletroferograma do padrão de citrulina analisada em 207nm.....	82



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Metodologias resumidas para precipitação de proteínas.....	69
Quadro 2 - Parâmetros comumente encontrados na literatura para análise de citrulina por CLAE .....	73



## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Comprimento do intestino residual de pacientes e a citrulina sérica destes .....	40
Tabela 2 - Pacientes com síndrome do intestino curto, seu nível de adaptação e sua quantidade de citrulina .....	40
Tabela 3 - Correlação dos níveis de citrulina plasmática com estágio da doença de Chron. ....	41
Tabela 4 - Manifestação da AR e seus valores de Anti-PCC .....	48
Tabela 5 - Valores de FR e anticorpo Anti-PCC em pacientes com AR e DPOC .....	48
Tabela 6 - Disfunções que ocorrem na Sepse grave.....	52
Tabela 7 - Fases estacionárias testadas .....	76
Tabela 8 - Análise da repetibilidade e precisão intermediária .....	78
Tabela 9 - Análise do percentual de recuperação.....	79
Tabela 10 - Faixa avaliada para linearidade.....	79
Tabela 11 - Limites de detecção e quantificação .....	80
Tabela 12 - Análise de repetibilidade e precisão intermediária .....	83
Tabela 13 - Análise do percentual de recuperação.....	83
Tabela 14 - Parâmetros avaliados na linearidade .....	83
Tabela 15 - Limite de detecção e quantificação.....	84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH – Ácido acético  
ACPA – Anticorpo antiproteína citrulinada  
ACN - Acetonitrila  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
Anti-CCP – Anticorpo peptídeo citrulinado cíclico  
Anti-MCV – Anticorpo vimentina citrulinada ARG – Arginina  
apoA-IV – Apolipoproteína A IV  
APCI – Ionização química a pressão atmosférica  
AR – Artrite reumatoide  
ASS – Argininosuccinato sintetase  
ASL – Argininosuccinato liase  
ATP – Adenosina trifosfato  
CIT – Citrulina  
CIT-CII – Colágeno tipo II citrulinado  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
CO – Monóxido de carbono  
CV – Coeficiente de variação  
DAO – Diamina oxidase  
DMSO - Dimetilsufóxido  
DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ECq - Eletroquímico  
EC – Eletroforese Capilar  
ELISA – Ensaio imuno enzimático  
eNOS - Óxido nítrico sintetase endotelial  
EOF – Fluxo eletrosmótico  
FDA – Food Drug Administration  
F<sub>1</sub>O<sub>2</sub> – Frações inspirados de oxigênio  
FL – Fluorescência  
GLN – Glumina  
GLN-ase – Glutaminase  
GLU – Glutamano  
GLUSAL – Glutamato semialdeído  
GLP-2 – Peptídeo semelhante ao glucagon 2  
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido fosfórico  
H<sub>2</sub>O - Água  
Hcit – Homocitrulina  
HCO<sup>3-</sup> - Bicarbonato

ICH – International Conference on Harmonisation  
iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida  
KDP – Fosfato monopotássico  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio  
IL-6 – Interleucina6  
IL 8- Interleucina8  
IL-10 – Interleucina 10  
ILAS – Instituto Latino Americano de Sepse  
IR – Índice de refração  
IRA – Insuficiência renal aguda  
IRC – Insuficiência renal crônica  
LC/MS – Cromatografia líquida/espectrômetro de massa  
LPS – Lipopolissacarídeo  
Micro-CT – Microtomografia  
MS – Espectrômetro de massa  
MeOH - Metanol  
NaAc – Acetato de sódio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de sódio  
nNOS - Óxido nítrico sintetase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
NP – Nutrição parenteral  
OAT – Ornitinaamino transferase  
OCT – Ornitilcarbamoil transferase  
OPA – *Orto*-ftalaldeído  
ORN – Ornitina  
OTC – Ornitina carbamilase  
PAD – Peptilarginina deiminase  
P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> – Pressão parcial de oxigênio  
PITC - Fenilisotiocianato  
PO – Prolina oxidase  
PRO – Prolina  
P5CS – Pirrolina-5-carboxilato sintase  
P5C – Pirrolina-5-carboxilato  
RPM – rotações por minuto  
SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia  
SIC – Síndrome do intestino curto  
SOFA – Sequência na falência dos órgãos  
THF –Tetrahidrofurano  
TLR-4 – Receptor toll tipo 4  
Tr – Tempo de retenção

UTI – Unidade de Terapia Intensiva  
UV/vis – Ultravioleta/visível



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>31</b>
3.1	CITRULINA .....	31
<b>3.1.1</b>	<b>Considerações Gerais.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Biossíntese da Citrulina .....</b>	<b>32</b>
3.1.2.1	Biossíntese Intestinal.....	32
3.1.2.2	Biossíntese Hepática (Ciclo da Ureia).....	33
3.1.2.3	Biossíntese do Óxido Nítrico (NO).....	36
3.2	CITRULINA COMO MARCADOR DE FUNÇÃO INTESTINAL .....	37
<b>3.2.1</b>	<b>Síndrome do Intestino Curto – Insuficiência/Falência .....</b>	<b>37</b>
3.2.1.1	Ensaios Pré-Clínicos.....	38
3.2.1.2	Ensaios Clínicos da citrulina como marcador da síndrome do intestino curto.....	39
3.3	CITRULINA COMO MARCADOR DE FALÊNCIA RENAL .....	41
<b>3.3.1</b>	<b>Ensaios Pré-Clínicos .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Ensaios Clínicos.....</b>	<b>43</b>
3.4	CITRULINA COMO MARCADOR DE ARTRITE REUMATOIDE .....	44
<b>3.4.1</b>	<b>Ensaios Pré-Clínicos .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Ensaios Clínicos.....</b>	<b>47</b>
3.5	CITRULINA NOS PROBLEMAS CARDIOVASCULARES	49
<b>3.5.1</b>	<b>Ensaios Pré-Clínicos .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Ensaios Clínicos.....</b>	<b>51</b>
3.6	CITRULINA COMO MARCADOR NA SEPSE.....	51
<b>3.6.1</b>	<b>Ensaios Pré-Clínicos .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Ensaios Clínicos.....</b>	<b>54</b>
3.7	CITRULINA E METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	55
3.8	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	58
<b>3.8.1</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>58</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Eletroforese Capilar (EC) .....</b>	<b>59</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>63</b>
4.1	AMOSTRA.....	63
4.2	TRATAMENTO DAS AMOSTRAS .....	63

4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	63
4.4	ELETROFORESE CAPILAR (EC) .....	64
4.5	VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS (CLAE E EC).....	64
<b>4.5.1</b>	<b>Seletividade/Especificidade.....</b>	<b>64</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Precisão.....</b>	<b>64</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Exatidão.....</b>	<b>65</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Linearidade .....</b>	<b>65</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1	TRATAMENTO DA AMOSTRA .....	67
5.2	ANÁLISES POR CLAE.....	70
<b>5.2.1</b>	<b>Validação dos parâmetros analíticos por CLAE .....</b>	<b>78</b>
5.2.1.1	Seletividade .....	78
5.2.1.2	Precisão.....	78
5.2.1.3	Exatidão.....	78
5.2.1.4	Faixa de Linearidade .....	79
5.2.1.5	Limites de Detecção e Quantificação .....	79
5.3	ANÁLISES POR EC .....	80
<b>5.3.1</b>	<b>Validação dos parâmetros analíticos por EC .....</b>	<b>82</b>
5.3.1.1	Seletividade .....	82
5.3.1.2	Precisão.....	82
5.3.1.3	Exatidão.....	83
5.3.1.4	Faixa de Linearidade .....	83
5.3.1.5	Limites de Detecção e Quantificação .....	84
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO A – (CARTA DE APROVAÇÃO, PROJETO Nº 242/2012).....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cada ano ocorre um acréscimo no número de patologias conhecidas, tanto pela descoberta de novos agentes patogênicos e modificação genética dos já conhecidos, como também por meio do descobrimento de novas síndromes e doenças pelo advento tecnológico. Com a descoberta de novas doenças ocorre uma intensa busca por um tratamento eficaz, assim como para um diagnóstico mais preciso que possibilite acompanhar a evolução da doença resultando em um melhor suporte terapêutico (GONZAGA et al., 2008; WHO, 2014).

Dentro desse âmbito, o uso de marcadores bioquímicos endógenos podem ser úteis, uma vez que podem facilitar o diagnóstico e/ou controle do desenvolvimento da doença (SCHLATZER et al., 2012; BLOCK; ALGECIRAS-SCHIMNICH, 2013; LASCHI et al., 2014).

Essa intensa busca por novos marcadores tem resultado em alguns casos de sucesso, como pode ser observado na falência intestinal, a qual hoje tem um marcador, a citrulina, que permite de modo menos invasivo acompanhar a evolução da doença e/ou o transplante intestinal (CRENN et al., 2000; CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; BAILLY-BOTUHA et al., 2009; ROCHA et al., 2011; VARGAS, 2013).

A citrulina é um aminoácido não proteico que por muitos anos foi subestimado, sendo considerado somente um intermediário do ciclo da ureia. No entanto, em decorrência de pesquisas pela procura de um melhor diagnóstico para a síndrome do intestino curto, esse aminoácido foi ganhando destaque, uma vez que seu metabolismo ocorre no epitélio intestinal. Essa descoberta permitiu e incentivou o interesse dos pesquisadores, o que contribuiu para a realização de novos estudos (JAYAPRAKASHA; CHIDAMBARA MURTHY; PATIL, 2011; NOORDALLY et al., 2012; CRENN et al., 2013; DUSAD et al., 2013; WARE et al., 2013).

Uma das barreiras na busca por novos marcadores ocorre pela problemática de trabalhar com amostras biológicas. Por ser uma matriz complexa, existe uma grande dificuldade de validação metodológica pela gama de substâncias encontradas e pela alteração fisiológica dos metabólitos presentes na matriz. Ocorre ainda variação em relação as pessoas saudáveis e pacientes internados, já que estes fazem uso de uma diversidade de medicamentos que podem interferir nas análises. Além das dificuldades encontradas para analisar a matriz, também podem ocorrer problemas específicos em decorrência do analito (CURIS et al.,

2005; DE OLIVEIRA et al., 2008; MAO et al., 2010; VAN EIJK et al., 2012).

No caso específico da citrulina, além de ser uma substância com estrutura relativamente simples, ela apresenta poucos grupamentos cromóforos, o que pode dificultar a sua análise. No entanto, mesmo com o crescente interesse da área clínica na sua mensuração, a presença desta substância em matrizes altamente complexas tem dificultado a padronização e o desenvolvimento de metodologias precisas e exatas para sua análise e posterior implementação em uma rotina laboratorial(VAN DE POLL et al., 2007; SHIMBO et al., 2010; VAN EIJK et al., 2012).

Apesar dos crescentes estudos sobre a citrulina como possível marcador em várias patologias, dentre elas artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, funcionamento renal, entre outras; os estudos corroboram e indicam que sua mensuração é eficaz como marcador de funcionamento intestinal, embora o uso desse aminoácido em associação a outro marcador bioquímico pode vir a auxiliar em outros diagnósticos, como no caso da sepse(CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008; KAO et al., 2009; LUIKING et al., 2009; BAHRI et al., 2012; KAORE; AMANE; KAORE, 2013).

Como não há padronização metodológica, mesmo para o acompanhamento dos pacientes com síndrome do intestino curto, este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia analítica quantitativa que seja simples, de baixo custo e que possa vir futuramente a ser implementada como um exame de rotina. Para isso, o desenvolvimento utilizará as técnicas de eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para detecção e quantificação do aminoácido citrulina em amostras biológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do aminoácido citrulina.
- ✓ Desenvolver método por eletroforese capilar para determinação de citrulina
- ✓ Validar as metodologias de acordo com os parâmetros do ICH, FDA e resolução nº 899 da ANVISA.



## 3 REVISÃO DA LITERATURA

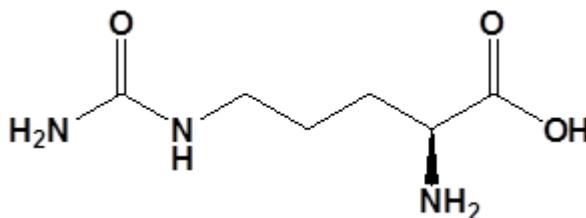
### 3.1 CITRULINA

#### 3.1.1 Considerações Gerais

A nomenclatura da citrulina teve origem no latim *Citrullus*, pois essa substância foi isolada inicialmente do suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad.), em 1930. Posteriormente, esse aminoácido foi detectado em outras cucurbitáceas, tais como melão, pepino e abóbora (RIMANDO; PERKINS-VEAZIE, 2005; COLLINS et al., 2007; KAORE; AMANE; KAORE, 2013).

A citrulina (CIT) ou ácido 2-amino-5-carbamoil-pentanoico (Figura 1) é um  $\alpha$  aminoácido não essencial e não proteico que participa do ciclo da ureia e constitui um produto da via da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; CURIS et al., 2005). Sua síntese ocorre principalmente nos enterócitos, com posterior liberação para corrente sanguínea, onde é captado pelos túbulos proximais renais e participa da neo-síntese da arginina (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; COSTA et al., 2012).

Figura 1 - Estrutura química do aminoácido citrulina.



Por muitos anos esse aminoácido foi esquecido pela comunidade científica, sendo apenas citado em livros como intermediário do ciclo da ureia, pois não era acreditado que ele podia ser importante como fator de diagnóstico de algumas doenças ou ainda participar de outras vias metabólicas (MOINARD; CYNOBER, 2007). No final da década de 1970, entretanto, diversos estudos começaram a ser publicados, demonstrando que a maior parte da citrulina circulante provém do intestino, resultado da conversão de glutamina via glutamato (WINDMUELLER; SPAETH, 1975; WINDMUELLER, 1982).

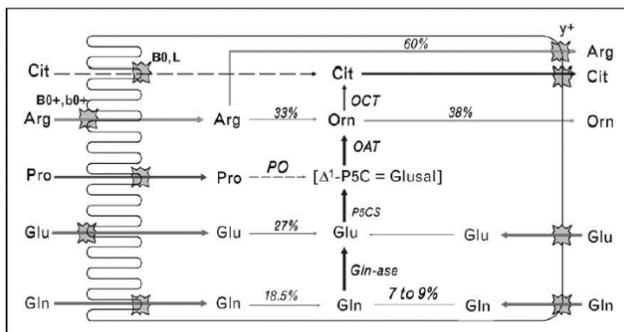
Essas descobertas contribuíram para o desenvolvimento de mais estudos que mostraram que o metabolismo da citrulina é mais complexo, podendo ser associado como marcador da função intestinal e renal, contribuindo para o monitoramento e/ou diagnóstico de algumas doenças como síndrome do intestino curto, doença de Crohn, artrite reumatoide, toxicidade digestiva à quimioterapia e radioterapia (HERZFELD; RAPER, 1976; LIGTHART-MELIS et al., 2008).

### 3.1.2 Biossíntese da Citrulina

#### 3.1.2.1 Biossíntese Intestinal

A via enzimática da biossíntese intestinal da citrulina é uma sequência complexa de pelo menos cinco enzimas mitocondriais nos enterócitos. As enzimas chave são OAT (ornitina aminotransferase) e a P5Cs (pirrolina-5-carboxilato sintase), sendo esta última expressa isoladamente na mucosa intestinal (Figura 2)(CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008; BAHRI et al., 2012).

Figura 2 - Metabolismo da citrulina nos enterócitos



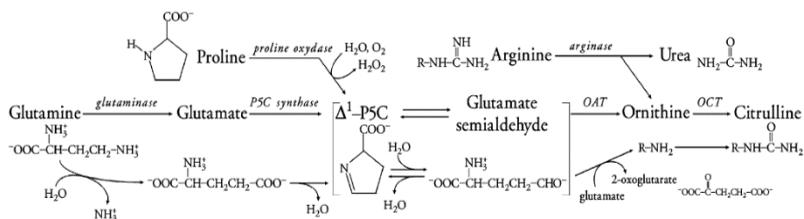
Arg, arginina; Cit, citrulina; D1-P5C, D1-Lpirrolina-5-carboxilato; Gln, glutamina; Gln-ase, glutaminase; Glu, glutamato; Glusal, glutamato semialdeído; OAT, ornitina aminotransferase; OCT, ornitina carbamoiltransferase; Orn, ornitina; P5Cs, D1-P5C sintase; PO, prolina oxidase; Pro, prolina. Porcentagens indicam a contribuição das diferentes vias do metabolismo de cada aminoácido. As setas tracejadas são para indicar as vias “secundárias”.

Fonte:(CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007)

Para sua síntese no enterócito são necessárias duas moléculas de glutamato, sendo que uma destas fornece o esqueleto de carbono (via P5Cs) e que pode ser substituída por outros aminoácidos como a prolina; enquanto a segunda contribui com o grupo amino terminal (via reação direta de transaminação) (Figura 3) (BOELEN et al., 2005; CURIS et al., 2005).

Windmueller & Spaeth (1981) realizaram um estudo pioneiro de em ratos, demonstrando que a arginina, além da glutamina, também pode ser convertida em citrulina no enterócito pela presença das enzimas arginase II e ornitina carbamoiltransferase.

Figura 3 - Esquema representando as reações envolvidas na síntese de citrulina no enterócito



Fonte: Adaptado de Curis et al., 2005

### 3.1.2.2 Biossíntese Hepática (Ciclo da Ureia)

A citrulina pode ser diretamente sintetizada no tecido hepático a partir do ciclo da ureia, mas devido à alta atividade da enzima arginino succinatosintetase (ASS), a citrulina produzida é rapidamente transformada em arginosuccinato (WU; MORRIS, 1998; FLYNN et al., 2002; WU, 2009).

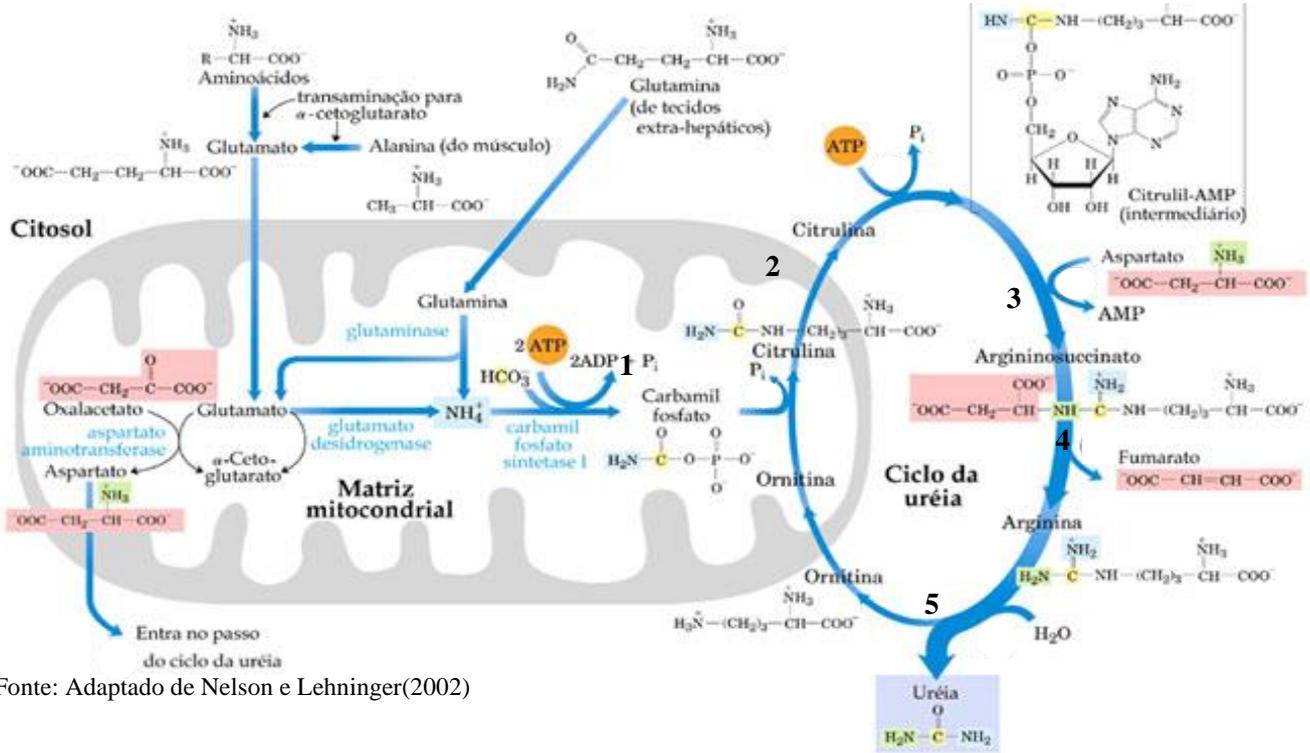
Em nosso organismo, a produção de amônia pode ser altamente tóxica para os tecidos. Para sua eliminação, que ocorre no fígado e rins, é necessária a presença de um produto que não cause danos às células. Para isto, a amônia combina-se enzimaticamente com o glutamato (GLU), através da glutamina sintetase, dando origem à glutamina (GLN) (Figura 4), a qual é capaz de realizar o transporte até o fígado para ser metabolizada (VAN DE POLL et al., 2007)

O ciclo da ureia ocorre em cinco etapas enzimáticas como pode ser observado na Figura 4. O ciclo tem início no interior da mitocôndria, mais especificamente nos hepatócitos, onde o primeiro grupo amino que entra no ciclo é derivado da amônia. Esta é reunida com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) na forma de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) produzido pelo ciclo de

Krebs para formar carbamil fosfato (1), cuja reação é dependente de ATP e catalisada pela enzima carbamil fosfato sintetase I(MORRIS JR, 2002).

O produto formado na primeira reação (carbamil fosfato) se une ao aminoácido ornitina com auxílio da enzima ornitina transcarbamilase, liberando fosfato e formando o aminoácido citrulina (2). Esta então passa para o citosol, onde outro grupamento amino, originado do aspartato é adicionado a citrulina por uma reação de condensação entre o grupo amino do aspartato com o grupo ureído (carbamil) da citrulina com auxílio da enzima arginino succinato sintase, formando o arginino succinato (3). A partir dessa etapa, o arginino succinato sofre uma quebra pela arginino succinato liase, liberando fumarato e arginina (4), a qual sofre uma reação de hidrólise pela enzima arginase dando origem a ureia e ornitina (5), retornando para o interior da mitocôndria para recomeçar o ciclo (CHEUNG; COHEN; RAIJMAN, 1989; CURIS et al., 2005).

Figura 4 - Ciclo da Ureia

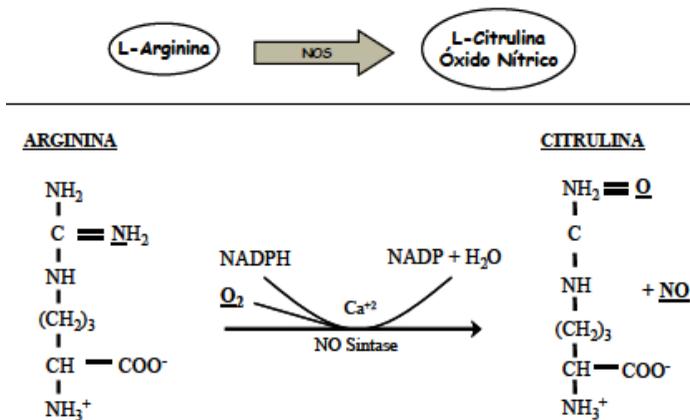


### 3.1.2.3 Biossíntese do Óxido Nítrico (NO)

Os enterócitos são os principais produtores de citrulina, embora as células do sistema imunológico possam produzi-la pela via do óxido nítrico. O óxido nítrico pode atuar como oxidante ou redutor dependendo do meio em que ele se encontra, sendo que entre suas principais funções estão relaxamento dos vasos sanguíneos, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, regulação da pressão sanguínea basal, adesão e agregação plaquetária (BARRACHINA; PANES; ESPLUGUES, 2001; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; GEORGE; GOW, 2009).

A produção do óxido nítrico nas células acontece a partir do uso do aminoácido arginina (ARG). A arginina é um composto intermediário na reação da óxido nítrico sintase (NOS), na qual o grupo guanidina é modificado pelo oxigênio molecular para formar óxido nítrico e citrulina (Figura 5) (WU; MORRIS, 1998; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; HALLEMEESCH; LAMERS; DEUTZ, 2002).

Figura 5 - Síntese de Óxido Nítrico a partir da Arginina



Fonte: (ZAGO; ZANESCO, 2006a)

A enzima óxido nítrico sintase possui três isoformas, que diferem em seu nível de expressão e localização. A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) atua como neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico, pois a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), presente em macrófagos, age em resposta a mediadores pró-inflamatórios, como

lipopolissacarídeos de membrana bacteriana, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a óxido nítrico endotelial (eNOS) pode ser encontrada nas células endoteliais, e regula o fluxo sanguíneo sendo um potente vasodilatador. Todas essas enzimas tem um mecanismo em comum para produção de NO a partir de arginina, com liberação de citrulina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; CURIS et al., 2005).

A citrulina pode ser usada como precursor do óxido nítrico devido a sua rápida transformação em arginina nos rins. Assim sendo, muitas células que metabolizam a arginina podem captar a citrulina circulante e realizar a sua converção em arginina (HECKER et al., 1990; SESSA et al., 1990; RAGHAVAN; DIKSHIT, 2001).

Algumas células não são capazes de utilizar citrulina para formação de óxido nítrico, pois muitas dessas células, como os neurônios, não possuem as enzimas arginino succinato sintetase (ASS) e arginino succinato liase (ASL), que atuam respectivamente na transformação de citrulina em arginino succinato e na quebra deste em arginina e fumarato (ESCOBALES et al., 2000; WIESINGER, 2001; WILEMAN et al., 2003).

O óxido nítrico possui uma meia vida na ordem de segundos, o que inviabiliza mensurações diretas do mesmo. Entretanto pode-se avalia-lo indiretamente, através conversão de L-arginina em L-citrulina ou mensurando a quantidade de nitrato e nitrito (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; LUIKING et al., 2009).

### 3.2 CITRULINA COMO MARCADOR DE FUNÇÃO INTESTINAL

#### 3.2.1 Síndrome do Intestino Curto – Insuficiência/Falência

A síndrome do intestino curto é caracterizada por um estado clínico onde ocorre má absorção intestinal em decorrência da perda de superfície mucosa, a qual pode ser originada de ressecção cirúrgica, fístulas, cirurgia bariátrica ou por meio de perda das células mucosas (enterócitos) por infecção ou isquemia (DIONIGI; ALESSIANI; FERRAZI, 2001; GOULET et al., 2004; DEIRDRE, 2006; ENTERAL, 2011; VARGAS, 2013).

Em alguns casos de síndrome do intestino curto ocorre uma deficiência absorptiva dos micronutrientes (água, vitaminas, eletrólitos e minerais) e macronutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas). Como resultado dessa deficiência, as necessidades diárias não são atingidas pela alimentação oral ou enteral, sendo necessário, às vezes, uma

intervenção com uso da terapia parenteral(MESSING; CRENN, 2000; JEPPESEN, 2003; O'KEEFE et al., 2006; NETO et al., 2011).

A síndrome do intestino curto pode ser caracterizada a partir da anatomia e/ou do funcionamento do órgão. A ressecção do intestino determina o comprimento e também o poder absorptivo do mesmo, além de influenciar na recuperação completada função intestinal (JEPPESEN, 2003; VAN HAREN, 2013).

Durante muitos anos foram estudados marcadores que possibilitassem uma avaliação fidedigna do funcionamento intestinal. Os mais utilizados são a apolipoproteína A-IV (apoAIV), peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-2), diamina oxidase (DAO), teste de absorção de D-xilose e testes de permeabilidade. Contudo, estes testes são trabalhosos, além da longa esperar para um resultado, o que reflete em pouco sucesso na prática clínica(ROKKAS et al., 1990; DRUCKER et al., 1996; CRENN; MATUCHANSKY; MESSING, 1997; JEPPESEN, 2003; LÓPEZ et al., 2012; AMIOT et al., 2013; WEBB; BROOKE; DE SILVA, 2013).

Em busca de um marcador que seja mais adequado, estudos tem sido realizados no intuito de encontrar um biomarcador que esteja envolvido no metabolismo enterocitário, que atenda às necessidades de avaliar o funcionamento intestinal, e que auxilie na prática clínica. Dentro desse contexto, o aminoácido citrulina tem sido destacado, pois é sintetizado na sua maior parte pelos enterócitos, portanto sua concentração plasmática poderia estar relacionada com o funcionamento intestinal(CRENN et al., 2003; O'KEEFE et al., 2006; LÓPEZ et al., 2012; AMIOT et al., 2013).

### 3.2.1.1 Ensaios Pré-Clínicos

Com finalidade de avaliar a relação do intestino delgado com a produção de citrulina, Wakabayashiet et al. (1995)utilizaram ratos, os quais foram submetidos à retirada do intestino delgado, e acompanhados durante quatro semanas. Os resultados observados demonstraram uma redução significativa na concentração de arginina encontrada no plasma -, o que corrobora a hipótese do intestino ser o maior responsável pela produção de citrulina.

Avaliando a relação dos níveis de citrulina e a rejeição no transplante intestinal, Honsovaet al. (2009) utilizaram 24 porcos, separados em grupos, os quais foram acompanhados por 30 dias por meio de biópsias intestinais, e tiveram os níveis de citrulina mensurados no plasma. Os autores encontraram valores diminuídos de citrulina

quando havia rejeição intestinal nos casos moderados e graves, sugerindo que esta pode ser utilizada como exame complementar em casos de transplante intestinal.

### 3.2.1.2 Ensaios Clínicos da citrulina como marcador da síndrome do intestino curto

Em 1997, Crenn e colaboradores avaliaram 109 pacientes, dos quais 57 apresentavam função intestinal normal (controle normal) e 52 haviam sido submetidos à cirurgia para retirada de porções intestinais (ressecção intestinal), todos com alimentação livre. A quantificação do plasma desses pacientes indicou que os indivíduos submetidos à cirurgia apresentaram uma quantidade inferior de citrulina quando comparado ao grupo normal, indicando que a concentração de citrulina não está relacionada com a alimentação, mas sim com o funcionamento dos enterócitos existentes. Esse resultado reforça a hipótese de que este aminoácido possa ser um eficiente marcador da função intestinal.

Em outro estudo, realizado com 57 pacientes, os mesmos tiveram os seus intestinos reduzidos em pelo menos duzentos centímetros. Os resultados apresentados mostraram que a concentração plasmática de citrulina para os pacientes tratados foi inferior a dos pacientes do grupo controle normal ( $20 \pm 13$  vs.  $40 \pm 10$   $\text{mmol.L}^{-1}$ ;  $p \leq 0,001$ ) (CRENN et al., 2000).

Jianfeng e colaboradores (2005) verificaram a concentração de citrulina sérica em pacientes com síndrome do intestino curto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os valores de citrulina detectados nos pacientes foram quatro vezes superiores aos detectados em pessoas saudáveis.

A ressecção intestinal é mais complexa em crianças do que em adultos, pois naqueles pacientes existe a incerteza do comprimento intestinal restante e variações no tônus muscular, uma vez que elas estão em fase de crescimento. Dessa forma, Rhoads e colaboradores (2005) avaliaram os níveis plasmáticos de citrulina e sua relação com o funcionamento intestinal em crianças com idade inferior a quatro anos com a síndrome do intestino curto (SIC) e que recebiam nutrição parenteral (NP). Os resultados encontrados em crianças saudáveis ( $31,2 \pm 1,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e crianças com SIC e NP ( $14,1 \pm 2,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ )  $p \leq 0,01$  mostraram que nas crianças com SIC e NP houve uma menor produção de citrulina devido ao SIC.

Bailly-Batuna e colaboradores (2009) monitoraram os níveis de citrulina plasmática no processo de retirada da NP em 31 crianças (idade

variando de um mês a 15 anos) por cromatografia de troca iônica, relacionando os níveis encontrados com o comprimento do intestino residual (Tabela 1). Os autores concluíram que o uso da citrulina como marcador pode ser útil principalmente para prever a recuperação intestinal.

Tabela 1 - Comprimento do intestino residual de pacientes e a citrulina sérica destes

Comprimento intestinal (cm)	Pacientes (n°)	Citrulina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
>80	5	21,6 $\pm$ 9,47
40 – 80	14	11,4 $\pm$ 8
$\leq$ 40	12	7,83 $\pm$ 4,7

Em trabalho realizado por López et al. (2012), a concentração de citrulina foi avaliada por CLAE como acompanhamento do processo adaptativo de pacientes que haviam passado por ressecção intestinal e estavam em diferentes estágios da fase de adaptação. Os níveis de citrulina encontrados (Tabela 2) foram proporcionais ao estágio de recuperação do funcionamento intestinal, o que reforça a hipótese do uso desse aminoácido como marcador do funcionamento desse órgão.

Tabela 2 - Pacientes com síndrome do intestino curto, seu nível de adaptação e teores de citrulina

SIC	Citrulina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
NP	7,1 $\pm$ 4,1
Misto*	15,8 $\pm$ 8,9
Adaptado**	20,6 $\pm$ 7,5
Transplante	28,8 $\pm$ 10,1

\*paciente que recebe nutrição parenteral e enteral.

\*\*paciente se alimenta por via oral.

Duzentos e sessenta e nove pacientes com SIC ( $\leq$  150 cm de intestino) foram acompanhados durante 25 anos para análise da continuidade do uso NP, processo de readaptação e sobrevivência. Os parâmetros avaliados foram a citrulina plasmática, presença ou ressecção do cólon e tamanho do intestino residual. Ao longo desses 25 anos, foi observado que os pacientes que mantiveram o cólon tiveram uma melhor resposta à retirada da NP, da mesma forma que o monitoramento dos níveis de citrulina contribuiu para o processo de retirada da NP (AMIOT et al., 2013).

Os estágios da doença de Crohn são classificados segundo um index, o qual prevê o uso de exames como endoscopia, proteína C reativa e taxa de sedimentação eritrocitária. Em pesquisa realizada por Lee e colaboradores (2013), os autores correlacionaram os níveis de citrulina plasmática com exames previstos pelo index, buscando uma forma menos invasiva para classificar e analisar esses pacientes. Foram analisados 63 pacientes portadores da doença de Crohn em diferentes estágios (Tabela 3). Os dados obtidos no estudo sugerem que os níveis de citrulina encontrados podem ser relacionados com estágio da doença.

Tabela 3 - Correlação níveis de citrulina plasmática com estágio da doença de Chron.

Atividade (escala)	Classificação	Citrulina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
0 – 10	Inativa	$19,5 \pm 7,6$
10 – 30	meio da doença	$14,6 \pm 8,4$
$\geq 30$	moderada a grave	$13,4 \pm 8,6$

### 3.3 CITRULINA COMO MARCADOR DE FALÊNCIA RENAL

A insuficiência renal é caracterizada pela incapacidade dos rins de removerem produtos de degradação ou de realizar suas funções reguladoras (equilíbrio hídrico, eletrolítico, ácido-base e regulador hormonal). As substâncias que normalmente são eliminadas na urina acumulam-se nos líquidos corporais em consequência da excreção renal comprometida, acarretando a ruptura das funções endócrinas e metabólicas (RANDALL, 2009; KHWAJA, 2012).

A disfunção renal pode ser classificada em aguda ou crônica. A Insuficiência Renal Aguda (IRA) é assim chamada quando há uma redução no funcionamento renal que pode durar horas ou dias, mas geralmente é uma situação temporária. As principais características observadas são uma diminuição na velocidade de filtração glomerular, o que gera disfunções no equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-base (CENDOROGLIO NETO; YOUNES-IBRAHIM; SANTOS, 2001; RIBEIRO et al., 2008; NUNES et al., 2010).

A Insuficiência Renal Crônica (IRC) é caracterizada pela perda progressiva e, frequentemente, irreversível da filtração glomerular. As principais causas dessa síndrome são: diabetes, hipertensão arterial e distúrbios (glomerulonefrite, lúpus, genéticos, malformações do órgão, entre outros) (KHWAJA, 2012; LEVEY; CORESH, 2012).

O diagnóstico é realizado pela sintomatologia e parâmetros laboratoriais, e os exames normalmente solicitados para diagnosticar

IRA e IRC são exames de sangue (ureia, creatinina, bicarbonato, sódio, potássio, ácido úrico, cálcio e fósforo), urina (sedimento urinário, sódio e creatinina) e por imagem (ultrassonografia e tomografia computadorizada) (CENDOROGLO NETO; YOUNES-IBRAHIM; SANTOS, 2001; NUNES et al., 2010; LEVEY; CORESH, 2012).

Segundo Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), um em cada dez adultos tem IRC. O último censo da SBN, divulgado em 2012, mostrou que mais de 90 mil brasileiros fazem diálise, com um custo anual de dois bilhões de reais e uma alta taxa de mortalidade (SESSO et al., 2012).

Apesar de a IRA ser diagnosticada mais rapidamente do que a IRC, e possuir maior possibilidade de cura, ela apresenta uma taxa de mortalidade superior à da IRC, pois aproximadamente 50% dos pacientes vão a óbito. Vários fatores contribuem para esse prognóstico, entre eles a falência múltipla dos órgãos e a septicemia (CENDOROGLO NETO; YOUNES-IBRAHIM; SANTOS, 2001; NUNES et al., 2010; KHWAJA, 2012).

Os rins são essenciais para sobrevivência do ser humano, podendo ser afetado por diversas patologias, resultando em uma alta taxa de mortalidade. Devido as graves consequências mostra-se necessário a busca de alternativas tanto na área terapêutica quanto no diagnóstico. Para esta última, tem-se buscado um marcador bioquímico endógeno, onde alguns estudos têm apontado para o uso da citrulina como esse possível marcador (CURIS et al., 2005; LEVEY; CORESH, 2012; STENVINKEL; JOHNSON, 2013).

Pelo fato de ser metabolizado pelos rins e participar da síntese endógena da arginina, a escolha do aminoácido citrulina torna-se promissor como marcador de disfunção renal, pois após ser produzida pelo epitélio do intestino delgado, as células dos túbulos proximais nos rins a retiram da circulação sanguínea e a convertem em arginina (BOUBY et al., 1993; CURIS et al., 2005; CRENN; CYNOBER, 2010; BAHRI et al., 2012).

### **3.3.1 Ensaios Pré-Clínicos**

Análises *in vitro* e *in vivo* em ratos com IRC nefrectomizados não apresentaram diferença na concentração de arginina, contudo, houve um expressivo aumento de citrulina plasmática e arterial, dado esse que os autores relacionaram com o declínio do funcionamento néfron (BOUBY et al., 1993).

Afim de melhor compreender o uso de citrulina como marcador de falência renal, Mitsuoka et al. (2009) investigaram as características de transporte desse aminoácido através de modelo *in vitro* de células epiteliais renais. Os resultados indicaram que em células tubulares proximais, o transporte de citrulina é mediado por pelo menos dois sistemas de canais sódio dependentes e independentes, o que justificaria o uso desse aminoácido como marcador, principalmente, quando a parte afetada são os túbulos renais.

O uso do aminoácido citrulina como marcador do funcionamento renal pode ser complementado com o controle dos níveis de homocitrulina (HCit), que é a carbamilação de grupos amino em resíduos de lisina. Jaisson e colaboradores (2012) utilizaram plasma de camundongos C57BL/6 J nefrectomizados no intuito de avaliar a correlação entre citrulina e homocitrulina. Os valores encontrados para citrulina e homocitrulina mostraram uma correlação direta entre esses aminoácidos com a falência renal.

### 3.3.2 Ensaios Clínicos

Ceballos e colaboradores (1990) conduziram um estudo com 81 pacientes ambulatoriais com IRC, avaliando se esta influenciava nas concentrações plasmáticas de aminoácidos não essenciais, dentre eles a citrulina. Os resultados encontrados mostraram que houve um aumento significativo de citrulina de forma proporcional ao estágio da doença, e que este valor estava correlacionado com a concentração plasmática de creatinina.

Lau et al. (2000) investigaram quantitativamente a arginina, citrulina e outros metabólitos em pacientes com falência renal em estágio terminal. Os valores encontrados reforçam o uso de citrulina como marcador de falência renal, pois este aminoácido apresentou teores elevados nestes pacientes, enquanto os níveis de arginina apresentaram valores normais.

Pacientes internados por mais 48hs na unidade de tratamento intensivo foram incluídos em um estudo que avaliava o possível uso de citrulina como marcador de falência renal. Os grupos foram formados conforme a classificação da sequência na falência dos órgãos (SOFA), e classificando os valores de citrulina em baixo ( $0-15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), médio ( $16-35 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e alto ( $>36 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Os ensaios demonstraram que a concentração de citrulina estava relacionada com a falência intestinal, não havendo sido encontrado valores significativos para disfunção renal.

Contudo, os autores alegaram que esses valores podem estar alterados devido à disfunção intestinal (NOORDALLY et al., 2012).

Os estudos encontrados a respeito do uso de citrulina como marcador de função renal foram contraditórios, uma vez que alguns justificam que esta seria um bom marcador para essa função, enquanto outros demonstram que não há alteração da citrulina na falência, a não ser que a função intestinal também esteja prejudicada (CEBALLOS et al., 1990; MOINARD; CYNOBER, 2007; PITON et al., 2010; JAISSON et al., 2012; NOORDALLY et al., 2012).

Por fim, é importante destacar que na maioria dos estudos que apontavam o uso da citrulina como marcador, havia alguma alteração intestinal, o que pode interferir nos resultados obtidos. Além disso, esse aminoácido é captado pelos túbulos proximais, o que sugere que o seu uso seria restrito como marcador para essa região, pois para que esse aminoácido fosse um marcador de função renal provavelmente seria necessária a busca por outro fator que complementasse e corroborasse com os resultados da citrulina.

### 3.4 CITRULINA COMO MARCADOR DE ARTRITE REUMATOIDE

Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica e crônica, de origem autoimune. Sua principal característica é a inflamação das articulações, embora outros órgãos possam ser atingidos. A doença afeta cerca de 1% da população adulta e pode ocorrer em qualquer idade, embora seja mais comum após os 40 anos de idade (LEE; WEINBLATT, 2001; BÉRTOLO et al., 2007).

A AR atinge grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Por ser uma doença que atinge o sistema imunológico, pode vir a comprometer o funcionamento de outros órgãos como pulmão e coração, causando pleurite e pericardite, respectivamente, o que aumenta a morbidade e gravidade dessa doença, podendo levar a uma redução na expectativa de vida (LAURINDO et al., 2004; BÉRTOLO et al., 2007; DEIGHTON et al., 2009).

O diagnóstico de AR é realizado com base em vários critérios clínicos e laboratoriais. Há toda uma sintomatologia que a pessoa deve relatar, dentre elas rigidez matinal e nódulos reumatoides. Já na área laboratorial, o paciente deve apresentar valores elevados para o fator reumatoide sérico e alterações nas radiografias (descalcificação ou erosões) (LAURINDO et al., 2004; DEIGHTON et al., 2009).

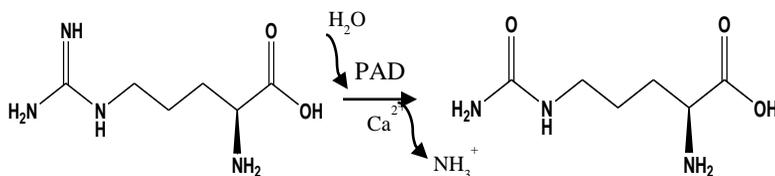
O exame laboratorial utilizado para acompanhamento e diagnóstico é o fator reumatoide (FR), embora este não seja específico para AR, pois pode apresentar valores elevados por outras doenças como hepatite crônica, infecção viral crônica, leucemia, mononucleose infecciosa e lúpus eritematoso sistêmico (BARTELS; RIBEL-MADSEN, 2013; FARID; AZIZI; MIRSHAFIEY, 2013; HIDALGO CALLEJA et al., 2013).

Nos últimos anos, houve uma ampla procura por marcadores mais específicos e sensíveis para diagnosticar e acompanhar a evolução da AR. Nessa busca uma família de auto anticorpos contra proteínas citrulinadas vem ganhando destaque (VAN BOEKEL et al., 2002; ALARCON; ANDRADE, 2007).

Apesar da citrulina não ser um aminoácido proteico, na AR acontece um processo no qual proteínas que contêm resíduo de arginina são catalisadas pela enzima peptidilarginina deiminase (PAD) em citrulina (Figura 6), resultando em proteínas que possuem resíduo de citrulina (DE CEULENEER et al., 2012; KAORE; AMANE; KAORE, 2013; SANCHEZ-PERNAUTE et al., 2013).

Realizando uma pesquisa na base de dados SCOPUS com as palavras “rheumatoid arthritis citrulline” e “anti-CCP arthrites” encontrou-se mais de 2500 artigos relatando o uso desses auto anticorpos contra proteínas citrulinadas como marcador na AR, o que denota tratar-se de um tema relevante. Foi escolhido citar ao longo do texto alguns desses trabalhos para demonstrar sua importância.

Figura 6 – Peptidil arginina deiminase (PAD) convertendo ARG em CIT



Fonte: Adaptado (ALARCON; ANDRADE, 2007)

O diagnóstico precoce de AR pode auxiliar o tratamento e prognóstico do paciente. A detecção do anticorpo contra peptídeo citrulinado cíclico (Anti-CCP) pode ser utilizado para o diagnóstico antes do surgimento dos sintomas, diminuindo os danos e deformidades nas articulações, pois pode ser detectado de forma prévia a qualquer

manifestação da doença (SUZUKI; YAMADA; YAMAMOTO, 2007; KAORE; AMANE; KAORE, 2013).

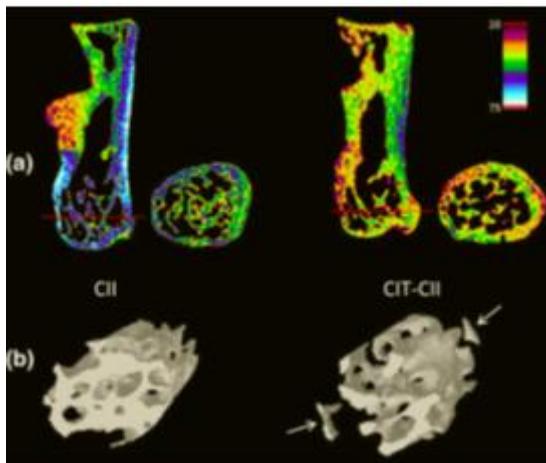
### **3.4.1 Ensaios Pré-Clínicos**

Empregando-se o modelo de artrite em ratos, foi avaliada a presença de anti-CCP, PAD e antígeno citrulinado na fase aguda e crônica da doença. Os autores verificaram a presença da enzima PAD em animais saudáveis e doentes, contudo, nos animais saudáveis não havia proteínas citrulinadas, indicando que a enzima não estava ativa. Os autores verificaram também evidências que a formação de antígenos citrulinados estaria associada com a progressão do processo inflamatório, já que a formação dos anticorpos é altamente específica para AR (VOSSENAAR et al., 2003).

Para investigar a resposta dos fibroblastos sinoviais à fibrina citrulinada, Sanches et al. (2013) utilizaram cultura de células de líquido sinovial (RASf). Os resultados encontrados a partir da cultura de células mostraram que houve aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8 induzidas pelo TLR-4, quando os fibroblastos foram expostos à fibrina citrulina, fato que sugere que esta é responsável por induzir uma intensa resposta inflamatória em pacientes com AR.

O anticorpo anti-proteína citrulinada (ACPA) pode estar relacionado com o aumento da osteoclastogênese, elevando a reabsorção óssea que caracteriza a AR. Para correlacionar os efeitos da citrulinização nas articulações e ossos, um modelo de artrite em camundongos foi empregado. O modelo foi desenvolvido utilizando a imunização de colágeno tipo II citrulinado (CIT-CII) em camundongos DAB/1. Os resultados encontrados (Figura 7) mostraram haver relação entre a perda de colágeno e cartilagem, com níveis elevados de ACPA (DUSAD et al., 2013).

Figura 7 - Imagens Micro-CT do calcâneo de animais tratados com CII (Controle negativo) e CIT-CII. A cor azul representa alta densidade óssea, que se perde significativamente no grupo tratado. (b). Aumento de fragmentação óssea representado pelas setas.



O teste pela busca do anticorpo da anti-proteína citrulinada é bastante específico para pacientes com AR, embora cerca de 30% desses pacientes apresentem resultado falso negativo. A fim de reduzir essa porcentagem, Szarka et al. (2014) desenvolveram um painel de teste com peptídeos citrulinados composto por filagrina, vimentina e colágeno. Os autores encontraram uma especificidade entre 81 a 95% nestes ensaios, valores próximos aos encontrados em kits comerciais, mostrando que o painel com esses peptídeos pode auxiliar no diagnóstico da AR.

### 3.4.2 Ensaios Clínicos

Considerando a existência de vários Kits para analisar anti-CCP disponíveis no mercado, Coenen et al. (2007) verificaram a acurácia desses testes, utilizando 298 amostras de soro em seis diferentes kits. O desempenho encontrado foi variável, pois alguns ensaios apresentaram linearidade e reprodutibilidade ruins, além de uma grande variação nos valores dos títulos. Para a análise da sensibilidade, os resultados variaram de 69,6% a 77,5%, enquanto que para a especificidade os valores ficaram entre 87,8 e 96,4%.

Para determinar a especificidade do teste anti-PCC, Li e colaboradores (2011) avaliaram 1018 amostras de soro de doadores saudáveis, sendo 212 com AR e 435 com outras patologias. A positividade para anti-PCC foi de 48,1% (429,7U) para o grupo com AR, 2,6% (29,3U) doadores saudáveis e 3,7 % (36,5U) pacientes com outras doenças.

Recentemente, vimentina citrulinada, uma proteína altamente liberada no líquido sinovial, foi identificada como um auto antígeno (anti-MCV) que auxilia no diagnóstico da AR juntamente com anti-CCP. Neste contexto, Bartoloni (2012) realizou ensaios com a finalidade de comparar o uso de vimentina citrulinada e anti-CCP como diagnóstico para AR. Para isto foi empregada 512 amostras de soro, sendo 285 de pacientes com AR, 136 com outras doenças autoimunes e 91 pessoas saudáveis. O anti-MCV resultou em uma sensibilidade de 59% e uma especificidade de 92%, enquanto que o anti-PCC apresentou sensibilidade de 77% e especificidade de 96%. O teste anti-MCV demonstrou ter uma menor sensibilidade do que anti-PCC, não contribuindo para o diagnóstico de AR.

Estudos tem mostrado que anti-PCC pode estar presente em outras doenças, como na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) além da AR (ELKAYAM et al., 2006; ATTA et al., 2007; LIMA; SANTIAGO, 2010). Para verificar essa teoria, Yang (2013) criou dois grupos compostos por 63 pessoas com AR (Tabela 4 e 5), e 70 pacientes com DPOC (Tabela 5). Os valores do anticorpo Anti-PCC em pacientes com DPOC não foram significativos para o controle da doença, embora nos pacientes de AR, foi possível associar os títulos encontrados com a gravidade da doença.

Tabela 4 - Manifestação da AR e seus valores de Anti-PCC

Classificação	Atividade da Doença	Anti-PCC (U.mL <sup>-1</sup> )
< 1,6	Remissão	69,1 ± 151,5
1,6 – 2,4	Baixa	72,9 ± 145,7
2,4 – 3,6	Moderada	91,8 ± 124,4
>3,6	Alta	104,9 ± 130,7

Tabela 5 - Valores de FR e anticorpo Anti-PCC em pacientes com AR e DPOC

	AR	DPOC
Anti-PCC U/mL	115,4 ± 139,6	1,7 ± 0,9
Anti-PCC Positividade (%)	54,2	0
FR (IU/mL)	241 ± 347,5	31,4 ± 24,2
FR Positividade (%)	82,5	42,0

Os estudos demonstrados anteriormente não utilizam o aminoácido citrulina como marcador direto da artrite reumatoide. É utilizada como marcador uma proteína que sofre a ação da enzima PAD, a qual adiciona na parte terminal dessa proteína o aminoácido citrulina, sendo que este não é encontrado em proteínas normalmente. Essa proteína com resíduo de citrulina gera uma resposta no sistema imunológico, o qual é mensurado pelo teste de ELISA.

### 3.5 CITRULINA NOS PROBLEMAS CARDIOVASCULARES

As artérias, veias, capilares e as câmaras do coração (ventrículos e átrios) são revestidas por endotélio vascular, o qual desempenha uma gama de funções biológicas, participando de vias metabólicas e regulatórias. Além das funções especializadas, como a troca de gases na circulação pulmonar, fagocitose na circulação hepática e esplênica, há também a participação no controle da trombólise e trombose, crescimento vascular, interações entre plaquetas e leucócitos com a parede vascular, e tônus vasomotor (BAHIA et al., 2006).

Lesão ou ativação das células endoteliais, em resposta a fatores patológicos, levam a disfunção destas células, que pode ser definida como um desequilíbrio entre os fatores de relaxamento e constrição, entre os mediadores pró-coagulantes e anticoagulantes, ou entre substâncias estimuladoras e inibidoras do crescimento e proliferação celular (CARAMORI; ZAGO, 2000; BAHIA et al., 2006).

Por ser fundamental na regulação do tônus vasomotor pela síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras como óxido nítrico, prostaciclina, fator hiperpolarizante e pela liberação de substâncias vasoconstritoras como a endotelina-1e o fator de ativação plaquetário; o NO é o principal modulador do tônus vasomotor em situações fisiológicas, sendo continuamente secretado em pequenas quantidades pelas células endoteliais, mantendo o tônus arterial reduzido nas circulações sistêmica e pulmonar (CAPLIN; LEIPER, 2012).

Doenças como arteriosclerose, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca podem estar envolvidas com a disfunção endotelial. A hipertensão arterial possui uma alta incidência na população mundial e sua etiologia é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais. Há uma relação entre pressão arterial elevada e o risco de doenças cardiovasculares. O NO produzido pelas células endoteliais exerce papel importante no controle cardiovascular, tanto no controle da resistência periférica como na agregação plaquetária, sendo um potente

vasodilatador e exercendo papel relevante no controle da pressão arterial (CARAMORI; ZAGO, 2000; ZAGO; ZANESCO, 2006b).

Como já descrito anteriormente, o NO é produzido pela conversão da arginina em citrulina (Figura 5) e apresenta pelo menos três isoformas: nNOS, eNOS e iNOS. Por ser um radical livre ele é instável, o que dificulta a sua mensuração, embora possa ser avaliado indiretamente, a partir da conversão de arginina em citrulina ou pela quantidade de nitrato e nitrito (LUIKING et al., 2009; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010; BAHRI et al., 2012).

A mensuração do NO é essencial para o entendimento da sua função nos processos biológicos, principalmente nos provindos da disfunção endotelial, como por exemplo, na isquemia cardiovascular. A sua presença é frequentemente determinada com base no efeito fisiológico, como relaxamento dos vasos sanguíneos, ativação da guanilil ciclase, aumento na concentração de GMPc, produção de citrulina ou inibição da agregação plaquetária.

Este composto também pode ser avaliado por inibidores da sua síntese, como análogos da arginina ou hemoglobina. Para obtenção de dados quantitativos sobre o NO é utilizado a medidade GMPc ou a concentração de citrulina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; CURIS et al., 2005; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010; KAORE; AMANE; KAORE, 2013).

### 3.5.1 Ensaios Pré-Clínicos

Investigando a influência da citrulina na produção de NO, duas linhagens de camundongos, uma com deficiência na enzima OTC ( $spf^{ash}$ ) e outra para o controle normal (C57BL6/J), foram utilizadas. Para as medições de arginina e citrulina utilizaram-se isótopos marcados sendo analisado por LC-MS. Os resultados mostram que a diminuição na concentração de citrulina resulta em um decréscimo na produção basal de NO, provavelmente devido à redução da síntese *de novo* da arginina (LUIKING et al., 2008).

Utilizando modelo *in vitro* com células de macrófagos murinos (RAW 264.7), foi verificado como os aminoácidos arginina, citrulina e glutamina influenciavam na produção de NO antes e após as células serem expostas a lipopolissacarídeos (LPS). Constatou-se que a viabilidade de arginina é um fator limitante para produção de NO, sendo a citrulina um potencial substituto para restaurar sua produção quando a arginina estiver em baixas concentrações (BRYK et al., 2008).

Hoje se tem conhecimento que há correlação entre hiperlipidemia e isquemia cardiovascular. Fazendo uso de ratos albinos, El-Kirsh (2011) pesquisou a influência da dieta hipercalórica e lipídica com uso de suplementação dos aminoácidos citrulina e arginina. O estudo demonstrou que a dieta utilizada causou danos na aorta e alterações bioquímicas nesses animais. Porém, a suplementação com os aminoácidos citrulina e arginina melhorou os danos causados na aorta e os índices bioquímicos, além de elevar os níveis de NO, sugerindo que a citrulina e arginina podem auxiliar no efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico.

### **3.5.2 Ensaios Clínicos**

Pacientes com insuficiência cardíaca (n=30), portadores da comorbidade hipertensão arterial, foram divididos em dois grupos nos quais cada um recebeu uma suplementação com os aminoácidos ARG (3g/dia) e CIT (3g/dia) durante 60 dias. Com auxílio da fotopletismografia foi detectada uma melhora na disfunção endotelial com uma diminuição na pressão arterial sistólica e diastólica, e pressão sistólica arterial pulmonar, fato que resultou em uma melhora no diâmetro diastólico ventricular (OREA-TEJEDA et al., 2010).

No estudo mencionado anteriormente, demonstrou que o uso da suplementação com aminoácido citrulina aumenta a produção de óxido nítrico e consequentemente aumenta a resposta imunológica e cardiovascular e não utilizando o aminoácido citrulina como marcador de falência cardiovascular. A sua suplementação em associação com o aminoácido arginina, teria um resultado positivo na síntese do óxido nítrico, sendo um auxiliar terapêutico e não voltado para área de diagnóstico. Contudo, este pode vir a auxiliar na mensuração do óxido nítrico quando a produção ocorrer diretamente da arginina gerando como sub-produto a citrulina.

### **3.6 CITRULINA COMO MARCADOR NA SEPSE**

Sepse é uma palavra de origem grega que significa decomposição, e que foi citada pela primeira vez em um poema de Homero, mostrando ser uma patologia que afeta a população desde os tempos mais remotos da história. É possível defini-la como um conjunto de manifestações graves em todo o organismo produzidas por uma infecção que resulta em uma resposta inflamatória exacerbada (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009; DELLINGER et al., 2013).

A sepse pode ser classificada em três estágios: primeiro, quando há uma infecção e ocorre uma manifestação sistêmica a essa infecção; segundo, quando ocorre disfunção em algum órgão ou uma hipoperfusão tecidual; (sepse grave) (Tabela 6) e terceiro, quando ocorre hipotensão ou hipoperfusão induzida pela sepse (choque séptico), sendo refratária à reanimação volêmica adequada e havendo necessidade de administração de agentes vasopressores (DE MATOS; VICTORINO, 2004; FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009; DELLINGER et al., 2013; VENKATARAMAN; KELLUM, 2013).

Tabela 6 - Disfunções que ocorrem na Sepse grave.

<b>Parâmetros utilizados na classificação de Sepse grave</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotensão</li> <li>• Lactato acima dos valores normais</li> <li>• O débito urinário &lt;0,5 mL/kg/h durante mais de 2 horas, apesar de reposição adequada de líquidos</li> <li>• Lesão aguda pulmonar com <math>Pa_{O_2}/F_{iO_2} &lt; 250</math> na ausência de pneumonia como fonte de infecção</li> <li>• Lesão aguda pulmonar com <math>Pa_{O_2}/F_{iO_2} &lt; 200</math> com pneumonia como fonte de infecção</li> <li>• Creatinina &gt; 2,0mg/dL (176,8 <math>\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</li> <li>• Bilirrubina &gt; 2,0 mg/dL (34,2 <math>\mu\text{mol}^{-1}\text{L}</math>)</li> <li>• Contagem de plaquetas &lt; 100,000 <math>\mu\text{L}</math></li> </ul>

Fonte: (DELLINGER et al., 2013).

A sepse é uma doença grave, geralmente com rápida evolução, e que caso não tratada adequadamente pode levar a falência múltipla dos órgãos. Isto ocorre quando a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção terapêutica, levando a um processo orgânico contínuo e dinâmico, que pode variar desde uma leve disfunção e/ou até a falência total do órgão, resultando em morte do paciente (JÚNIOR et al., 2006; ZANON et al., 2008; OPAL, 2011).

Mundialmente há uma elevada taxa de mortalidade decorrente da sepse, sendo que no Brasil essa taxa chega a 65%, enquanto a média mundial é 40%. Em 2009, um estudo chamado Progress acompanhou várias instituições com a finalidade de adquirir mais dados sobre a septicemia em unidades hospitalares. Este estudo indicou que a mortalidade por sepse no Brasil é maior que a de países como Índia e Argentina (BEALE et al., 2009).

Atualmente a sepse é uma das principais causas de morte nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), superando o infarto do miocárdio

e o câncer e ocupando cerca de 30% dos leitos em UTI, com permanência média de 44 dias no ambiente hospitalar. Além da necessidade de internação prolongada, é imprescindível um suporte vital, o que resulta em um tratamento de alto custo (ZANON et al., 2008; WESTPHAL et al., 2012).

Devido à alta incidência, gravidade e custo da sepse foi desenvolvida uma campanha mundial denominada de *Sobrevivendo a Sepse*, a qual é coordenada pelo Instituto Latino Americano de Sepses (ILAS). A campanha visa uma unificação dos critérios de diagnóstico e tratamento bem como uma redução na taxa de mortalidade nos próximos cinco anos. A campanha está abrangendo todos os profissionais da saúde, organizações políticas e financiadoras, além de pacientes e seus familiares.

Nas últimas décadas, houve um grande avanço na compreensão dos mecanismos referentes à septicemia os quais tem auxiliado a um melhor entendimento além de possibilitar um melhor tratamento dos pacientes. Porém na área de diagnóstico não houve muitos avanços, pois até a confirmação e identificação do agente infeccioso há a um período de espera que pode prejudicar o tratamento desse paciente, mesmo adotando-se a terapêutica para manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco (HOLLENBERG et al., 2004; JÚNIOR et al., 2006; VENKATARAMAN; KELLUM, 2013).

O Hospital Sírio Libanês lançou um protocolo de diagnóstico e tratamento em 2013, buscando a identificação precoce desses sintomas nos pacientes. Neste protocolo, o diagnóstico da sepse é realizado por sinais clínicos e achado laboratorial como febre, taquicardia, taquipneia, aumento do lactato, aumento ou redução dos glóbulos brancos e hemocultura positiva, devendo o paciente apresentar ao menos duas dessas alterações (CUNHA et al., 2013).

Os sinais e os achados laboratoriais citados anteriormente são na sua maioria inespecíficos para sepse, uma vez que podem ser encontrados alterados em outras enfermidades. Dessa forma, há a necessidade de se encontrar novos marcadores que possibilitem uma identificação precoce da sepse e que permita uma intervenção que seja mais efetiva para manutenção da vida desses pacientes (CIANCIARULLO et al., 2008; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

O aminoácido arginina está envolvido em vários processos metabólicos, dentre eles a produção de óxido nítrico e modulação do sistema imune. Durante a septicemia ocorre uma resposta inflamatória intensa em conjunto com alterações metabólicas. A arginina pode ser utilizada como marcador da sepse, contudo, seus níveis podem não ser

fidedignos, uma vez que pode ser obtida a partir da alimentação. Já a mensuração da citrulina, que é o seu precursor endógeno, não sofre influência da alimentação podendo ser utilizado como marcador da sepse (VAN WAARDENBURG et al., 2007; ASGEIRSSON et al., 2011).

### **3.6.1 Ensaios Pré-Clínicos**

Para avaliar a influência da suplementação com citrulina na resposta imunológica, Asgeirsson e colaboradores (2011) utilizaram ratos Wistar com modelo de sepse na ligação e perfuração cecal. Os autores verificaram que a suplementação com citrulina foi capaz de reduzir a resposta pró-inflamatória mediada pela interleucina6 (IL-6) e elevar a resposta anti-inflamatória mediada pela interleucina 10 (IL-10). Os autores sugerem ainda que os níveis de citrulina geralmente são baixos durante a sepse devido o alto consumo na síntese de arginina.

### **3.6.2 Ensaios Clínicos**

Kao et al. (2009) investigaram pacientes internados que apresentavam quadro de septicemia e avaliaram nestes o metabolismo de arginina, citrulina e síntese do NO com intuito de melhor compreender esses processos e o seu papel durante a sepse. A avaliação foi realizada por meio de infusão de isótopos marcados e analisados por LC/MS. Os resultados indicaram que ocorreu uma diminuição de arginina e citrulina na sepse, porém, a redução dos níveis de arginina está relacionada com uma falha na síntese *de novo* em decorrência a uma baixa síntese de citrulina.

Estudo realizado por Luiking et al.(2009), foi comparado os níveis de citrulina, arginina e NO em pacientes internados na UTI; pacientes em choque séptico e não sépticos. Os níveis arginina e óxido nítrico detectados de estavam levemente reduzidos, contudo, a concentração de citrulina estava bastante reduzida, o que resultou em alteração nos níveis de arginina e óxido nítrico. Com esses dados, os autores sugerem que a citrulina pode ser usada em conjunto com outros parâmetros para acompanhar pacientes em sepse.

Um grupo de pesquisadores averiguou os níveis de citrulina como prognóstico em 67 pacientes internados em UTI com sepse e choque séptico. As concentrações do aminoácido observadas foram menores do que os valores normais. Adicionalmente, os autores correlacionaram a gravidade dos pacientes com a concentração encontrada. Por meio de

análise multivariável foi constatado que os níveis de citrulina inferiores a 10 $\mu$ mol/L nas primeiras 24horas estava associado com maior taxa de mortalidade (PITON et al., 2010)

Pacientes em choque séptico que recebiam tratamento convencional com insulina e corticosteroides foram estudados para avaliar a concentração de citrulina e sua relação com fatores inflamatórios e translocação bacteriana digestiva. Os valores de citrulina estavam reduzidos nos pacientes com sepse, porém, a redução foi mais acentuada nos pacientes que possuíam translocação bacteriana, pois os parâmetros pró e anti-inflamatórios estavam elevados. Dessa forma, o aumento da proteína C reativa foi inversamente proporcional com a diminuição dos níveis de citrulina, mostrando que há relação entre os níveis de citrulina e a gravidade da sepse (CRENN et al., 2013).

Os pacientes em septicemia geralmente tem uma evolução do quadro para falência múltipla dos órgãos. Nesse estágio, a citrulina pode contribuir de forma isolada para demonstrar o órgão afetado, sugerindo agravamento intestinal e renal. Dentro do contexto como marcador isolado para sepse, ela não teria uma grande contribuição sugerindo apenas o órgão afetado. Contudo, há estudos que demonstram que o uso de citrulina e a mensuração de catecolaminas, principalmente do adrenocromo, a forma oxidada da adrenalina como potenciais marcadores para antever o quadro séptico (HOFFORD et al., 1996; MILLER et al., 1997; MCKENZIE et al., 2002; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007; NOORDALLY et al., 2012; OSTROWSKI et al., 2013; STEELMAN et al., 2014).

### 3.7 CITRULINA E METODOLOGIAS ANALÍTICAS

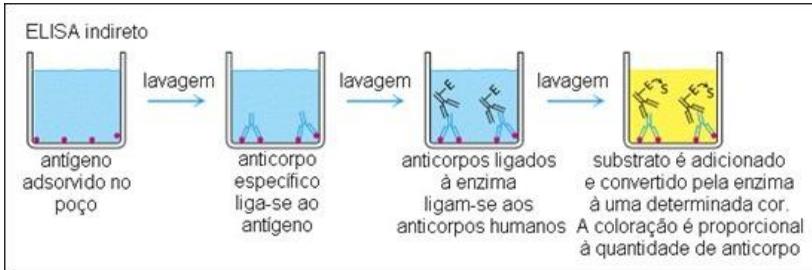
Muitos estudos tem sido realizados com o aminoácido citrulina, principalmente, devido a sua crescente importância clínica, como auxiliar no diagnóstico de artrite reumatoide, falência renal e intestinal. Contudo, por se tratar de uma substância com estrutura relativamente simples, com poucos grupamentos cromóforos e, presente em uma matriz altamente complexa, existe uma dificuldade de padronização e desenvolvimento de metodologias precisas e exatas para a análise deste metabólito (CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008; ALONSO et al., 2011; BAHRI et al., 2012).

Os trabalhos encontrados referentes a proteínas citrulinadas e seus derivados como marcadores de AR utilizam principalmente ensaios imuno-enzimáticos para o doseamento dessas substâncias. Esta técnica

pode ser utilizada para a pesquisa de anticorpos ou antígenos, porém, a maioria dos trabalhos encontrados é para a pesquisa de anticorpos.

A utilização dessa metodologia é possível, pois há marcação com agentes cromóforos, ocorrendo formação de cor conforme a interação do agente com a presença desses anticorpos (Figura 8). A técnica possui ainda alta sensibilidade e especificidade, sendo relativamente rápida, além de possibilitar a automatização. Contudo, ela detecta a proteína que têm o aminoácido citrulina como resíduo terminal e não o aminoácido em si, não servindo, dessa forma, para identificar e quantificar o aminoácido livre (VAN BOEKEL et al., 2002; CENTENO, 2004; CURIS et al., 2005; ALARCON; ANDRADE, 2007).

Figura 8 - Esquema de realização da técnica ELISA indireto na pesquisa de anti-PCC



Fonte: Página Biomedicina padrão. Disponível em:

<http://www.biomedicinapadrao.com/2010/05/elisa.html> acesso fevereiro de 2014

Os estudos desenvolvidos que utilizam a mensuração dos níveis de citrulina como marcador de função intestinal, renal, problemas cardiovasculares ou no processo de sepse utilizam geralmente técnicas cromatográficas e espectroscópicas (ESCOBALES et al., 2000; LAU et al., 2000; CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; BAILLY-BOTUHA et al., 2009; VAN EIJK et al., 2012; WEBB; BROOKE; DE SILVA, 2013).

Os trabalhos encontrados que utilizam a técnica de CLAE por fase reversa necessitam de derivatização da amostra. Este procedimento é realizado para que ocorra a introdução de grupamentos cromóforos, considerando que a substância de interesse está em uma matriz complexa e não é fluorescente (HECKER et al., 1990; LINGEMAN, 1990; MOLNÁR-PERL, 2003; KANG et al., 2006; CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; PAPADIA et al., 2010; MAO et al., 2011; LEE; KO; SEO, 2013; SASE et al., 2013).

O procedimento de derivatização geralmente é realizado com uma exposição prévia da amostra com o reagente de derivatização e com auxílio de uma pré ou pós-coluna. Os agentes mais utilizados para o estudo da citrulina são *o*-ftalaldeído e ninidrina, os quais atuam nas aminas primárias formando um composto de coloração azul ou roxa. O composto formado na reação é pouco estável, pois ainda na reação pode ocorrer à formação de produtos ou artefatos que venham interferir durante a análise cromatográfica. A reprodutibilidade da reação de derivatização também é um problema bastante relatado, além dos problemas que podem ocorrer devido à toxicidade desses produtos. (LINGEMAN, 1990; MOLNÁR-PERL, 2003; CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007).

Na cromatografia de troca iônica o uso de ninidrina é mais comum, sendo utilizada com uma pós-coluna. Apesar de apresentar uma boa reprodutibilidade, ela apresenta uma baixa sensibilidade. Já no CLAE com coluna de fase reversa, geralmente é usado o *o*-ftalaldeído com uma pré-coluna, mas ao contrário da ninidrina ele apresenta problema de reprodutibilidade (CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008).

Para a quantificação de citrulina, alguns trabalhos encontrados fazem uso de isótopos marcados para realizar análise por CLAE. Contudo, o uso dessa técnica além de possuir um custo elevado demanda tempo, pois o paciente necessita passar um período de jejum e receber infusão que contém os isótopos marcados, a qual costuma durar horas. Esta característica torna o seu uso inviável, visto que a quantificação desse aminoácido geralmente é realizada em pacientes que estão debilitados e correm risco de morte (BOUBY et al., 1993; LAU et al., 2000; BOELENIS et al., 2005; VAN DE POLL et al., 2007; VAN EIJK et al., 2012).

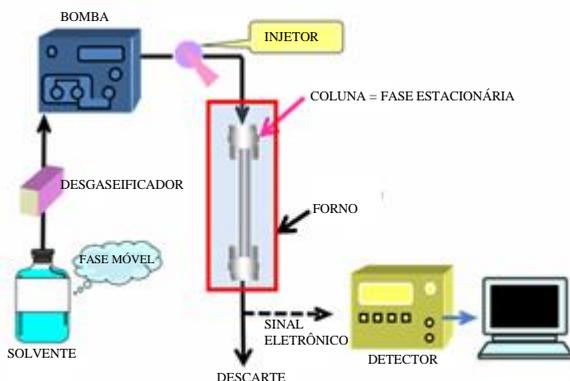
Alguns trabalhos sugerem o uso de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. Essa técnica é uma das mais sensíveis e precisas para quantificação e identificação desse aminoácido, porém os equipamentos são de alto custo. Com essas características citadas, torna-se pouco provável implementar essa técnica para um teste de rotina em uma unidade hospitalar (CURIS; CRENN; CYNOBER, 2007; LUIKING et al., 2008; VAN EIJK et al., 2012; LEE; KO; SEO, 2013; TANG et al., 2013).

## 3.8 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

### 3.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas para separar e determinar compostos em uma grande variedade de matrizes. O seu uso se deve principalmente a facilidade de manuseio e boa sensibilidade na separação e quantificação de compostos de interesse biológico. Na Figura 9 há a representação de um cromatógrafo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 2011).

Figura 9 - Esquema de funcionamento da técnica CLAE



Fonte: Página da Shodex. Disponível em: <http://www.shodex.net/>

Após ocorrer a separação dos compostos pelo processo cromatográfico, existe a necessidade de um sistema que seja capaz de detectar cada composto. Os cinco principais detectores para CLAE são: índice de refração (IR), ultravioleta (UV), fluorescência (FL), eletroquímico (EC) e espectrômetro de massas (MS), sendo o detector de UV mais comum devido ao fato de possuir uma boa seletividade, sensibilidade, além do baixo custo e simplicidade quando comparado aos demais (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A análise de aminoácidos por CLAE é muito utilizada, principalmente, nos laboratórios de análises clínicas e indústria de alimentos, sendo desenvolvidos vários métodos para suas análises

(GÓMEZ-ARIZA; VILLEGAS-PORTERO; BERNAL-DAZA, 2005; GHESHLAGHI et al., 2008; CYNOBER, 2013).

A determinação dos níveis de aminoácidos ou outras substâncias como possíveis biomarcadores de doenças e síndromes metabólicas em amostras biológicas é interessante e a cromatografia tem sido de suma importância para a determinação dessas substâncias. Contudo ainda há obstáculos a serem ultrapassados nessa área, uma vez que a amostra biológica é uma matriz complexa(ZOPPA et al., 2006; ILISZ et al., 2012).

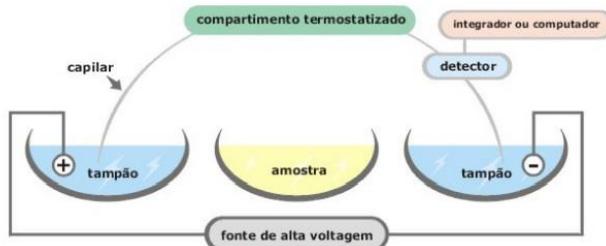
Um dos principais obstáculos encontrados é a variedade de substâncias que podem estar presentes nessa matriz, a variação que pode ocorrer de uma pessoa para outra, a estabilidade dos compostos e a complexidade destes. No caso de aminoácidos, muitas técnicas utilizadas para sua separação por CLAE contornaram esses problemas com o uso de agentes derivatizantes. Contudo, esse processo não é o mais adequado para uma grande rotina laboratorial, uma vez que como já citado demanda tempo, a reação pode formar produtos tóxicos e os artefatos podem interferir na análise(ELFAKIR, 2005; ZOPPA et al., 2006; WATERVAL et al., 2009).

A escolha da fase estacionária e móvel apropriada é essencial para uma análise adequada. A crescente tecnologia tem ofertado colunas recheadas com materiais especialmente preparados, que auxiliam no trabalho com amostras complexas. A escolha do detector também possui importante influência na análise. No caso dos aminoácidos em que há uma diversidade de compostos, a presença de grupos cromóforos possibilita utilização do detector ultravioleta/visível, permitindo selecionar o comprimento de onda mais adequado para sua identificação (SILVA et al., 2004; ELFAKIR, 2005; MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

### **3.8.2 Eletroforese Capilar (EC)**

A eletroforese capilar é uma técnica instrumental de separação, que foi implementada na década de 80. Nesta técnica, a separação ocorre por meio da migração diferenciada de compostos ionizáveis e até mesmo neutros sob a ação de um campo elétrico como pode ser visto na Figura 10(TAVARES, 1997).

Figura 10 - Ilustração do funcionamento do equipamento da EC

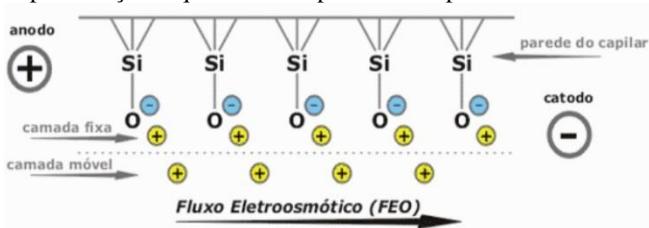


Fonte: Adaptado de Queiros e Jardim (2001)

Na EC, a separação é realizada em capilares com dimensões que variam de 15 a 100 $\mu$ m de diâmetro interno, os quais permitem uma melhor dissipação de calor e uma alta eficiência de separação com tempo reduzido. Nesta técnica, o capilar é preenchido com um eletrólito condutor e submetido à ação de um campo elétrico. A fonte de alta tensão estabelece um campo elétrico ao longo do capilar podendo operar com tensão constante (-30 a 30 kV) e/ou corrente constante (-200 a 200  $\mu$ A). Os eletrodos são de um material inerte geralmente de platina e o detector mais utilizado é o UV/Vis-DAD (TAVARES, 1997; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Existem dois fatores que são responsáveis pela separação dos compostos no interior do capilar, os fluxos eletroforético e eletrosmótico (EOF). O fluxo eletroforético é o movimento dos íons que ocorre devido à carga e o tamanho do íon sob a influência de um campo elétrico. Já o fluxo eletrosmótico acontece devido à ionização dos grupos silanos na parede do capilar. Esse fenômeno acontece ao se passar uma solução alcalina através do capilar, onde a superfície adquire uma carga negativa formando uma camada contra íon (Figura 11) (TAVARES, 1997; QUEIROZ; JARDIM, 2001; SOARES, 2006).

Figura 11 - Representação esquemática da parede do capilar



Fonte: Adaptado de Queiroz e Jardim (2001)

Ao se aplicar uma voltagem na entrada do capilar, um campo elétrico é gerado no seu interior e a camada difusa é afetada por forças elétricas, iniciando a migração dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Como esses íons estão solvatados por moléculas de água, esse deslocamento promove o EOF. O EOF está presente em todas as separações por EC, com maior ou menor intensidade, podendo ou não contribuir para a mobilidade das espécies iônicas que estão sendo separadas (TAVARES, 1997; SOARES, 2006).

A versatilidade da técnica de eletroforese capilar tem possibilitado a análise de diversos compostos em decorrência da sua variedade nos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna e pela sua simplicidade instrumental. No caso dos aminoácidos, essa técnica possibilita duas formas de detecção, uma vez que apresentam características anfóteras, ou seja, apresentam caráter ácido devido ao grupo carboxílico (-COOH) e básico devido ao grupamento amina (NH<sub>2</sub>) (LEE; LIN, 1994; CHEN; XU; IP, 1997; TAVARES, 1997).

O desenvolvimento de métodos por EC apresentam várias vantagens, dentre elas a questão de tempo, pois as análises geralmente são curtas e uma pequena quantidade de amostra é gasta, uma vez que o volume usado é na ordem de nanolitros, o que é interessante e favorece o trabalho com amostras biológicas, pois normalmente se possui pequena quantidade dessas amostras (TAVARES, 1997).



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRA

As amostras utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

Foi utilizado nesse trabalho plasma de pacientes internados e, com diagnóstico de sepse. Assim que recebidas, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem tratadas e analisadas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNESC (Projeto 242/2012, Anexo 1)

### 4.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a retirada das proteínas foi aplicado o kit Amicon<sup>®</sup> Ultra 15 e posteriormente foi utilizado o método de precipitação. Para isto foi empregado uma proporção de (1:4v/v), amostra:metanol, sendo então submetidas a refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Posteriormente, esta solução foi centrifugada por 12 minutos a 5600 rotações por minutos (rpm), sendo coletado o sobrenadante para análises posteriores.

### 4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O aminoácido citrulina foi analisado e quantificado pela técnica de CLAE em amostras de plasma previamente tratadas. As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu (Columbia, MD), o qual é composto por duas bombas LC10 AD e SPD 10-AV, detector UV/Vis, controle SCL – 10A e injetor manual com o loop de  $20\mu\text{L}$ . A aquisição dos dados foi realizada a partir do software Class-VP. Em paralelo, as mesmas amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido PerkinElmer<sup>®</sup> Series 200, equipado com detector UV/Vis, bomba binária, degaseificador *online*, forno, e amostrador automático com loop de  $20\mu\text{L}$ . Os dados foram processados no software TotalChrom Workstation. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C18 (250 x 4,6mm)  $5\mu\text{m}$  e como constituintes da fase móvel metanol (A) e tampão fosfato 30mM (B) em sistema isocrático até 5min (1%A); e posteriormente, gradiente até 40min (15%A) a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Os experimentos foram conduzidos em equipamento de EC modelo 7100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A., equipado com detector de arranjo de diodos e *software* (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados.

Os capilares utilizados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poliimida, 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, 46 cm de comprimento total e 37,5cm de comprimento efetivo, o qual foi ativado por 15 minutos com NaOH 1M, 20 minutos com H<sub>2</sub>O e 20 minutos com o eletrólito de corrida antes da primeira análise.

O eletrólito utilizado para as análises foi tampão fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 30 mM. As amostras foram introduzidas no capilar por injeção hidrodinâmica utilizando pressão de 50 mbar durante 4 segundos no modo direto. A temperatura no cassete do equipamento foi mantida a 60°C durante as análises. A tensão aplicada no inlet do capilar foi de 5,0 kV. No início de cada análise, o capilar foi condicionado por 100 segundos com NaOH 1M, 100 segundos com H<sub>2</sub>O e 150 segundos com o eletrólito de corrida.

#### 4.5 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS (CLAE e EC)

Para validação dessas metodologias foram utilizados guias como FDA (2001), Anvisa (2012) e ICH (2005), avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, especificidade, precisão, exatidão, recuperação, linearidade e limite de detecção e quantificação.

##### 4.5.1 Seletividade/Especificidade

Para determinar esse parâmetro foi utilizado replicatas da mesma amostra com padrão interno ( $n \geq 6$ ).

##### 4.5.2 Precisão

Este parâmetro avalia a repetibilidade e a precisão intermediária do método. A repetibilidade foi determinada utilizando três concentrações conhecidas do padrão (baixa, média e alta) em triplicata no mesmo dia. Já a precisão intermediária foi avaliada utilizando a

mesma amostra em três dias distintos. Os resultados foram expressos pelo percentual do coeficiente de variação (CV).

#### 4.5.3 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada por meio do ensaio de recuperação, que consiste na adição de substância de referência em uma concentração conhecida na amostra. O ensaio foi realizado em quintuplicata, com três diferentes concentrações. Os padrões, as amostras sem a adição dos padrões e as amostras contaminadas foram analisadas em quintuplicata. Os resultados foram expressos em percentual (%) de recuperação.

#### 4.5.4 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de uma curva analítica empregando padrão de citrulina, em triplicata, utilizando 7 pontos compreendidos na faixa de 12,5 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dissolvidos em um proporção  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (7:3 v/v).

#### 4.5.5 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os valores foram determinados com base no coeficiente angular e no desvio padrão (S) do coeficiente linear da curva analítica. Para determinar até qual concentração poderia ser distinguida o ruído do equipamento da concentração mínima quantificável foi utilizado o cálculo dos LD e LQ, expresso nas equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{S.\text{coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10 \frac{S.\text{coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 2}$$

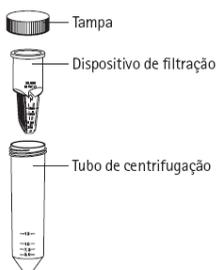


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TRATAMENTO DA AMOSTRA

As amostras foram recebidas em duplicata, sendo uma tratada pelo kit Amicon®Ultra-15 (Figura 12) e outra utilizada sem tratamento (PONT et al., 2013).

Figura 12 - Esquema adaptado do funcionamento do kit Amicon®Ultra-15



Fonte: Adaptado de Guia de uso Amicon® Ultra-15.

Para verificar o comportamento das amostras, foi realizada uma busca na literatura, indicando alguns parâmetros como fases móvel e estacionária mais comumente utilizadas para análise de citrulina. Após esta etapa, foi selecionada a fase móvel descrita por Jayaprakasha (2011), a qual era composta por ácido fosfórico 0,03mM, pH 3,0 e acetonitrila (ACN), com fluxo de  $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  em modo isocrático (75:25 v/v), e a fase estacionária BrownleeChoice C18 (150x4,6 mm i.d.; 5 $\mu\text{m}$ ) PerkinElmer®(VAN EIJK; ROOYAKKERS; DEUTZ, 1993; COLLINS et al., 2007; MAO et al., 2010).

O cromatógrafo escolhido para analisar as amostras foi da marca Shimadzu®, composto por duas bombas isocráticas LC10 AD e SPD 10 AV, detector UV/Vis, controle SCL – 10A e injetor manual com o loop de 20 $\mu\text{L}$ . O processamento dos dados foi realizado no software Class-VP.

Como pode ser observado na Figura 13 e 14, o cromatograma da amostra tratada e o da amostra sem tratamento demonstrou o alto grau de complexidade da amostra, principalmente no cromatograma da amostra de plasma que não foi submetida a nenhum tratamento prévio.

Figura 13 - Cromatograma da amostra teste tratada com o kit Amicon® Ultra-15

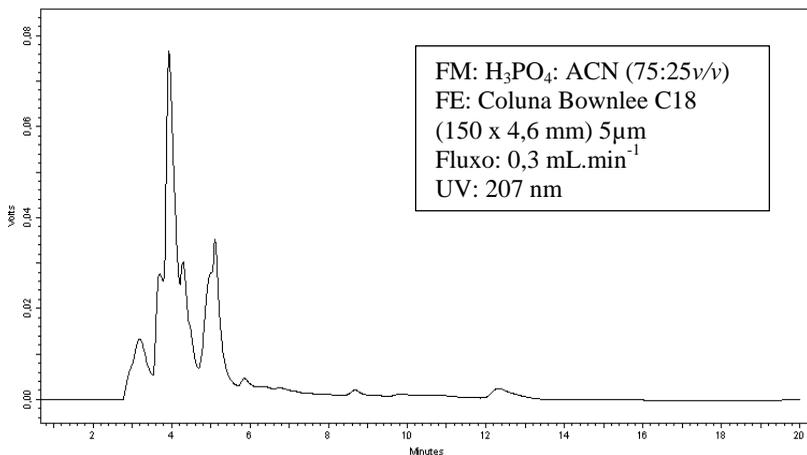
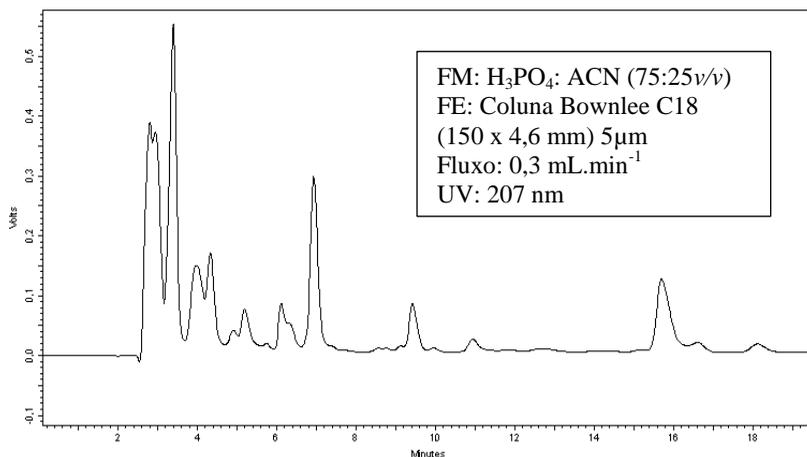


Figura 14 - Cromatogramada amostra teste não tratada.



A análise desses cromatogramas indicou a necessidade de trabalhar com amostras previamente tratadas com o kit Amicon® Ultra-15, visto que esta amostra apresentava uma menor quantidade de compostos sobrepostos sem que houvesse perda da substância de interesse.

Ao longo do desenvolvimento da metodologia, houve dificuldade em separar os picos na região de dois a seis minutos (Figura 13), mesmo com a utilização de uma fase móvel em gradiente. Em uma nova análise da literatura sobre tratamentos de amostras de mesma matriz, optou-se

por realizar alguns testes com o intuito de minimizar a influência da matriz nas análises, além de ter sido observado que em algumas amostras havia presença de precipitado no processo de degelo, o que seria indicativo da presença de proteínas (VAN EIJK; ROOYAKKERS; DEUTZ, 1993; COLLINS et al., 2007; PONT et al., 2013; SANCHEZ-PERNAUTE et al., 2013).

Foram encontradas diversas metodologias para o tratamento desse tipo de matriz, uma vez que o plasma é rico em proteínas como fibrinogênio, globulina e albumina, e a presença destes compostos poderia comprometer as análises. Algumas das metodologias encontradas podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1- Metodologias resumidas para precipitação de proteínas

Autores	Metodologia para precipitar proteínas
Zhang e Kaye (2004)	20µL amostra + 25µL etanol gelado, banho de gelo 10min, centrifugar 10.000g por 10min.
Collins (2007)	40µL amostra + 40 µL ácido perclórico (1,5M) + 900µL H <sub>2</sub> O + 20µL carbonato de potássio, centrifugar 10.000g por 1min.
Pérez-Neri et al. (2007)	Amostra: MeOH (1:1 v/v), centrifugar 15.000 rpm à 4°C por 15min.
Bowles et al. (2008)	50µL de amostra + 12,5µL de ácido sulfossalicílico, centrifugar 15.000rpm à 4°C por 15min.
Demarker et al. (2009)	10µL de amostra + 50 µL de ácido clorídrico (0,1mol.L <sup>-1</sup> ) + 1mL ACN:H <sub>2</sub> O (9:1 v/v), agitar, centrifugar 16.000g por 5min.
Mao et al. (2010)	Amostra + ACN ou Amostra + MeOH (1:3 v/v), centrifugar 10.000g por 15min.
Mao et al.(2011)	200µL amostra + 80µL ácido tricloroacético (0,1g.mL <sup>-1</sup> ), repouso 30s, incubar 75-80°C por 15min, centrifugar 10.000g por 15min.

Dentre as metodologias analisadas, optou-se por metodologias que utilizam a precipitação por solventes orgânicos como forma de retirada de proteínas. Essa metodologia, além de ser diferente da que estava sendo utilizada (kit Amicon<sup>®</sup>Ultra-15), é uma metodologia rápida e de baixo custo.

A desproteinização da amostra com solventes orgânicos acontece devido à propriedade hidrofóbica das proteínas. Ao entrar em contato com as proteínas, o solvente rompe as ligações fracas (ligações de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas), levando a desnaturação destas e a sua precipitação (NELSON; LEHNINGER, 2002; JIANG; HE; FOUNTOLAKIS, 2004).

Com base nessas informações, alguns solventes como ACN, metanol (MeOH) e ácido acético (AcOH) foram selecionados para a realização destes testes. Cabe destacar que o uso de ACN é o mais relatado na literatura, na proporção de uma parte de amostra para duas de solvente. Na presente dissertação, a escolha do solvente “ideal” ocorreu após as análises dos dados obtidos por CLAE e pela ausência de precipitação na amostra ao adicionarmos mais solvente à mesma.

O primeiro solvente a ser testado foi ACN na proporção 1:2(v/v). Em análise por CLAE, devido o baixo comprimento de onda utilizado, foi observada a presença de um pico referente à ACN, após o tempo de retenção da citrulina, excluindo dessa maneira o uso de ACN como solvente para precipitar proteínas (dados não apresentados).

O testes realizados com AcOH não foram promissores, uma vez que foi considerado o efeito que o pH poderia causar nas amostras, ionizando as mesmas; e também pelo grande volume de solvente necessário para que não houvesse resíduos de proteínas.

A utilização de MeOH como solvente na proporção 1:2, foi a mais promissora, visto que na análise por CLAE não houve interferência deste solvente no perfil do cromatograma obtido. Após a seleção do solvente a ser utilizado, foi dado início a escolha da proporção mais adequada para remoção de proteínas sem prejuízos ao analito de interesse.

Foram testadas as seguintes proporções: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 e 1:5 (v/v). Os resultados obtidos indicaram que a proporção 1:4 para tratar as amostras foi a mais adequada, pois em proporções inferiores havia ainda a presença de proteínas na amostra e, em proporções superiores, a amostra ficava muito diluída, impedindo a detecção dos compostos de interesse.

O procedimento selecionado consistia em pipetar 800µL de MeOH e 200µL de plasma e, posteriormente, colocá-los a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos. Após este período, as amostras eram centrifugadas durante 12 minutos em velocidade de 10000rpm.

## 5.2 ANÁLISES POR CLAE

O desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos incluem matrizes mais complexas, no qual há uma variedade de interferentes, o que torna o processo mais trabalhoso quando comparado ao processo de avaliação da qualidade de fármacos e medicamentos (FDA, 2001; ICH, 2005; ANVISA, 2012).

O desenvolvimento do método bioanalítico foi baseado nas características da amostra e no comportamento da citrulina nessa matriz, utilizando como guias para validação os *guidelines* do FDA (2001); ICH (2005); ANVISA (2012).

Como discutido anteriormente, a primeira escolha metodológica foi baseada na literatura, na qual a fase móvel era constituída por  $H_3PO_4$  0,03M pH 3 e ACN, e como fase estacionária a coluna BrownleeChoice C18 (150x4,6 mm i.d.; 5 $\mu$ m). Observando essas primeiras análises, optou-se por trocar a fase estacionária do sistema, uma vez que o tempo de retenção dos primeiros picos era inferior ao  $V_0$  do sistema. Dessa maneira, foi selecionada uma coluna com maior comprimento para verificar a influência desse parâmetro no tempo de retenção.

A coluna escolhida para os testes seguintes foi a Gemini C18 (250x4,6mm, 5 $\mu$ m). Para as análises com essa fase estacionária, foram mantidas as mesmas condições anteriores de fase móvel e de fluxo, gerando um aumento no tempo de retenção (tr) da citrulina presente na amostra.

Adicionalmente, foi explorada a utilização de uma diferente faixa de pH na fase aquosa. Mantendo as condições relatadas anteriormente e fazendo uso de agente acidificante (ácido clorídrico) e/ou alcalinizante (hidróxido de sódio), foi testada uma ampla faixa de pH (1-8) na fase composta por ácido fosfórico. As análises cromatográficas mostraram que há influência do pH na resolução dos compostos, sendo observado uma diminuição na resolução do pico correspondente ao analito de interesse e a co-eluição de vários outros compostos presentes na amostra quando ainda recebia o tratamento para retirada de proteínas com o kit.

Visto que durante as análises o pH exercia influência nas mesmas, foi decidido trabalhar com um pH próximo a neutralidade na fase móvel. A partir dessa decisão do pH para fase móvel, foi escolhido testar um sistema em gradiente. As análises desse teste não foram satisfatórias, uma vez que não houve separação do pico de interesse.

Outro fato a ser destacado é que há uma diversidade de detectores utilizados (Quadro 2), prevalecendo o uso do detector de fluorescência, e posteriormente o UV/Vis. Porém, todos faziam uso de algum agente de derivatização, sendo o principal OPA e Fenilisotiocianato (PITC).

Com relação às fases móveis descritas na literatura, apesar dos estudos avaliados terem feito uso em sua grande maioria de detectores diferentes ao nosso e por terem optado pelo uso de agentes de derivatização, foi decidido testar os mesmo constituintes de fase móvel para as nossas amostras com exceção do THF e do ácido propanoico.



Quadro 2- Parâmetros comumente encontrados na literatura para análise de citrulina por CLAE

Autores	Fase Estacionária	Fase Móvel	Detector
Patchett et al. (1988)	C18 (150x 4,6mm) 5µm	A: KDP pH: 5,93. B: ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O (4:3:3 v/v/v)	Fluorescência: λ <sub>ex</sub> : 338nm, λ <sub>em</sub> : 425nm
Koshiishi, Kobori e Imanari (1990)	TSKgel SCX (150 x 4 mm) 5 µm	A: Tampão citrato 50mM + Cloreto de sódio 0,3M pH 3,5	UV: 520nm
Hecker et al. (1990), Calberg (1994)	Supercosil (250 x 4,6mm) 5µm	A: MeOH B: 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + ACN+ MeOH + THF (84: 7,5: 7,5: 1 v/v/v/v)	Fluorescência: λ <sub>ex</sub> : 338nm, λ <sub>em</sub> : 425nm
Fekkes et al. (1995)	ODS II (125 x 3mm) 5µm	A: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250mM + ác. Propiônico250mM + ACN+ THF + H <sub>2</sub> O (20:20:7:0,2:51 v/v) pH 6,5 B: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250mM + ác. Propiônico250mM + ACN+ THF + H <sub>2</sub> O (20:20:7:0,2:51 v/v) pH 5,75 C: ACN: MeOH: DMSO: H <sub>2</sub> O (28:24:5:43 v/v)	Fluorescência: λ <sub>ex</sub> : 330nm, λ <sub>em</sub> : 440nm
Igarashi et al. (2000)	C8 (150x 4,6mm) 5µm	A: ACN: H <sub>2</sub> O: AcOH (15:85:0,2 v/v/v)	MS por ionização química a pressão atmosférica (APCI)

Continuação Quadro 2 - Parâmetros comumente encontrados na literatura para análise de citrulina por CLAE

Wu et al. (1997); Kohli et al. (2004); Collins et al. (2007)	C18 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m	A: NaAc 0,1 mol.L <sup>-1</sup> + 0,5% THF + 9% MeOH (pH 7,2) B: MeOH	Fluorescência: $\lambda_{ex}$ : 340 nm, $\lambda_{em}$ : 450 nm
Gómez-Ariza, Villegas-Portero e Bernal-Daza (2005)	(150 x 2,1 mm) 5 $\mu$ m	A: ACN:H <sub>2</sub> O (80:20 v/v) pH 3 B: MeOH: H <sub>2</sub> O (90:10 v/v) pH 3	MS (ESI)modo positivo
Gheshlaghi et al. (2008)	C18 (150 x 3,9 mm) 5 $\mu$ m	A: NaAc 50mM + TEA B: H <sub>2</sub> O + MeOH + ACN	UV: 254 nm
Mao et al. (2010)	C18 (300x3,9 mm) 5 $\mu$ m	A: NaAc 0,12M + EDTA 2,5 $\mu$ M + 2,5% ACN pH: 6,5 B: ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O (45:15:40 v/v/v)	UV: 254 nm
Van Eijk, Rooyackers e Deutz (1993); Boelens et al. (2005); Wijnands et al. (2012)	ODS II (150 x 4,6mm) 3 $\mu$ m	ACN: H <sub>2</sub> O (85:15v/v)	Fluorescência: $\lambda_{ex}$ : 335 nm, $\lambda_{em}$ : 440 nm

As condições relatadas no Quadro 2 foram testadas, contudo, os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que os cromatogramas não apresentaram resolução que permitisse a quantificação do analito de interesse. Essa diferença de resultado pode ser remetida ao fato de não termos utilizado o procedimento de derivatização das amostras.

Outros eluentes também foram testados [acetato de amônio, ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido acético, ácido trifluoracético, ácido fórmico, acetato de sódio, metanol, acetonitrila, tetraborato de sódio], incluindo combinações destes solventes, faixa de pH, e fases estacionárias distintas. Todavia, nenhuma combinação resultou melhora na resolução entre os componentes da mistura. Dessa forma, considerando a matriz e a procedência da amostra, foi avaliada a possibilidade do emprego de um sistema tamponante, buscando mimetizar as características do funcionamento do corpo humano.

Seguindo o fundamento que uma solução tampão é formada por um ácido fraco e seu sal ou base fraca e seu respectivo sal, para o preparo do sistema tamponante foi utilizada a equação de Henderson-Hasselbach (Equação 3), a qual calcula o pH desejado, a partir da constante de dissociação (pKa) e de concentrações do equilíbrio ácido-base por meio do logaritmo da base conjugada (A<sup>-</sup>) e seu ácido (HA).

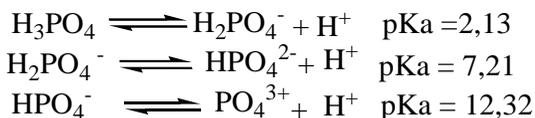
$$pH = pKa + \frac{\log[A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 3}$$

O ácido fosfórico é considerado um ácido poliprótico, pois apresenta três constantes de dissociação, as quais devem ser consideradas para calcular o equilíbrio na sua forma tamponante.

$$pH_{eq1} = \frac{pKa_1 + pKa_2}{2} \quad pH_{eq1} = \frac{pKa_2 + pKa_3}{2} \quad \text{Equação 4}$$

Dessa forma, foram considerados os pka provenientes da dissociação, apresentada na Figura 15. Foram testados algumas variações de pH as quais abrangeram uma faixa de pH de 2,0 a 9,5 sendo utilizado para estes testes uma coluna Gemini-NX (250x 4,6 mm; 5µm) com fase móvel constituída de tampão fosfato 0,03M (A) e MeOH (B).

Figura 15 - Reação de dissociação do ácido fosfórico.



Além de alterar o pH, foi realizado a modificação em outro parâmetro, o fluxo da fase móvel. As alterações realizadas mostraram que as melhores análises estavam entre a faixa de pH 6,5 à 7,5, com fluxo de 0,3mL.min<sup>-1</sup>.

Com relação ao pH, essa faixa selecionada foi a mais adequada para trabalhar, especialmente pelo fato desses analitos estarem presentes numa matriz que possui função tamponante e trabalha com uma variação de pH restrita entre 7,36 à 7,42 (LORENZI, 1992).

Com a definição de utilizar um sistema tamponante com uma faixa mais restrita de variação do pH, foram novamente iniciados testes com as possíveis fases estacionárias. Foram testadas as fases estacionárias listadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Fases estacionárias testadas

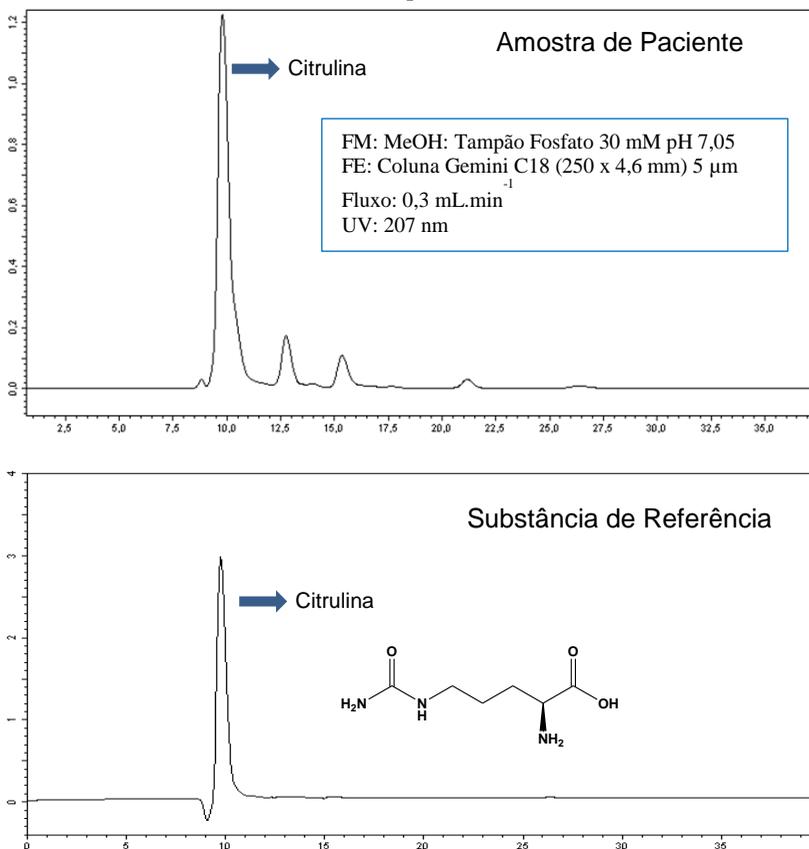
	Colunas	Especificações
1	Bownlee	C18 (150 x 4,6 mm; 5µm)
2	Bownlee	C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)
3	Bownlee	C8 (250 x 4,6 mm; 5µm)
4	Gemini	C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)
5	Gemini - NX	C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)
6	Kinetex	C18 (100 x 2,1 mm; 1,7µm)
7	BoncloneFenila	(300 x 3,9 mm; 10µm)
8	Kinetex	C18 (100 x 4,6 mm; 2,6µm)
9	Hilic	(100 x 3,0 mm; 2,7 µm)

A coluna 1 apresentada na tabela 7 foi utilizada para triagem como já mencionado anteriormente. Após algumas análises com intuito de melhorar o tempo de retenção e resolução do composto de interesse foram testadas as outras colunas apresentadas na tabela.

Tendo em vista todos os parâmetros analisados como fase estacionária, fase móvel, modificação do pH, temperatura, e fluxo a quantificação do analito de interesse foi efetuada a partir da utilização de um padrão externo (citrulina), fase estacionária GeminiC18 (250 x 4,6 mm; 5µm), fase móvel metanol (A) e tampão fostato de potássio 30mM (B) e detecção por UV a 207nm.

Para o desenvolvimento do método foram utilizadas amostras de plasma como já citado. Pode ser observado na Figura 16 o perfil cromatográfico das amostras utilizando as condições citadas anteriormente.

Figura 16 - Cromatograma de uma amostra de plasma e substância de referência citrulina, analisadas no comprimento de onda de 207nm.



Após a obtenção desses cromatogramas foi decidido dar início ao procedimento de validação.

## 5.2.1 Validação dos parâmetros analíticos por CLAE

A validação foi realizada com os parâmetros estabelecidos por *International Conference on Harmonization (ICH - GUIDELINE, 2005)*, *Food and Drug Administration Bioanalytical Method Validation (FDA – Guidance for Industry, 2001)* e a Resolução da Anvisa nº 899, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e quantificação.

### 5.2.1.1 Seletividade

A seletividade foi determinada por meio de co-injeção de amostra com substância de referência, sendo realizado com seis amostras. Foi possível observar o aumento proporcional das áreas dos picos correspondentes ao padrão, indicando que o método possui especificidade para a substância de interesse.

### 5.2.1.2 Precisão

A precisão do método foi obtida pelo coeficiente de variação (CV %) das amostras analisadas. A precisão foi determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária utilizando as concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados das análises podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8- Análise da repetibilidade e precisão intermediária

	Repetibilidade*			Precisão intermediária**		
	50	100	150	50	100	150
Citrulina	1,0	0,4	1,2	0,263	0,2	0,7

\*Valores expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

\*\*Valores expressos em CV (%).

Como pode ser observado, os valores foram inferiores aos 15% de variação permitida para amostra biológica conforme a resolução da ANVISA e FDA, o que confere precisão ao método (FDA, 2001; ANVISA, 2012).

### 5.2.1.3 Exatidão

A exatidão representa a concordância entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro. Para isto ela foi avaliada a partir do ensaio de recuperação, o qual utilizou as concentrações 25,50

e  $75\mu\text{g.mL}^{-1}$  para realizar as análises. As análises foram realizadas em triplicatas no mesmo dia. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 9 e demonstram a exatidão do método.

Tabela 9 - Análise do percentual de recuperação

Concentrações $\mu\text{g.mL}^{-1}$	%Recuperação
25	73,87
50	73,41
75	77,66
Média	74,98

Os valores encontrados para recuperação foram inferiores a 100%, contudo, pelo guia do FDA, os valores de recuperação podem ser superiores ou inferiores desde que ocorra reprodutibilidade, precisão e consistência entre os valores obtidos o que foi verificado nas análises (FDA, 2001).

#### 5.2.1.4 Faixa de Linearidade

A faixa de linearidade foi determinada pelas mensurações da amostra em diversas concentrações, ou seja, pela construção de curvas de calibração, sendo esta avaliada pelo cálculo de regressão linear. Para a construção da curva foram utilizadas sete diferentes concentrações sendo realizadas injeções em triplicata. Os valores podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 - Faixa avaliada para linearidade

	Faixa linear ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	$r^2$
Citulina	12,5 - 200	0,9905

#### 5.2.1.5 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção determina a menor quantidade de analito na amostra, a qual pode ser distinguida do ruído da análise. Já o limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão na metodologia descrita (FDA, 2001). Os valores encontrados para o aminoácido citrulina podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11- Limites de detecção e quantificação

	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Citrulina	4,07	12,34

Os valores encontrados podem ser classificados como elevados quando comparados com os trabalhos de Wang et al. (2013) e Harder et al. (2011), podendo a menor sensibilidade ser justificada por diferentes detectores e pelo fato das amostras nas análises deste trabalho não terem sido submetidas ao processo de derivatização.

### 5.3 ANÁLISES POR EC

O princípio utilizado pela eletroforese é diferente do fundamento da CLAE, sendo que aquela trabalha voltagens e cargas, o que pode favorecer compostos que possuem poucos grupamentos cromóforos, como no caso do aminoácido em estudo (SILVA et al., 2007).

Pelo fato da técnica de EC gerar uma alta resistência elétrica, promovendo um campo elétrico, há uma alta eficiência na separação dos analitos. Devido a estes resultados pode-se observar um aumento no número de pratos teóricos quando se compara a técnica de EC com a CLAE (TAVARES, 1997).

A partir de uma busca na literatura, observou-se mais comumente o uso de capilares com comprimento variando entre 10 a 100cm e com dimensões internas de 50 a 75 $\mu\text{m}$ . (BOULAT et al., 2001; BOURI et al., 2013; TŮMA; ŠTULÍK, 2013; POINSOT et al., 2014). A partir desse levantamento, optou-se por trabalhar com capilares com 60cm de comprimento e diâmetro interno de 50 $\mu\text{m}$ .

Pelo princípio da técnica, é preferível trabalhar com o composto na sua forma ionizada, sendo para isso necessário conhecer a constante de dissociação do composto. No caso da citrulina, a mesma é um aminoácido que apresenta características anfóteras, possuindo dois pKs, um pKa (2,43) e um pKb (9,41) (CURIS et al., 2005; HAYNES, 2012).

Após a inserção do capilar no cassete, foi realizado o acondicionamento do capilar pela primeira vez com NaOH (1M) durante 30 min, seguido de H<sub>2</sub>O também por 30 min e do eletrólito (BEG) por 40 min. Para o BEG, foram testados alguns tampões como tetraborato de sódio, acetato de amônio, tampão fosfato, EDTA, sulfato de cobre acidificado, ácido acético, hidroxietilcelulose, MeOH e ácido fórmico, sendo que todos foram testados em diferentes pHs e concentrações. Todas essas condições foram avaliadas, pois um dos principais fatores trabalhados na EC é o ajuste do pH.

Além dos parâmetros citados, foram trabalhadas outras variáveis como temperatura, tempo de injeção, voltagem (tanto negativa quanto positiva) e o comprimento do capilar. Dos testes realizados, o que apresentou melhor resolução foram aqueles que empregaram tampão fosfato de potássio 30mM e pH 7,05.

Com o ajuste das outras variáveis, foi possível obter melhores nas condições de uso: um tempo de injeção por pressão de 50 mbar por 4 segundos, uma voltagem de 5kV (o que gera uma corrente de 17 $\mu$ A) e uma temperatura de 60°C. Essas condições originaram os eletroferogramas apresentados na Figura 17 e 18.

Figura 17 - Eletroferograma da amostra de um paciente analisada em 207 nm.

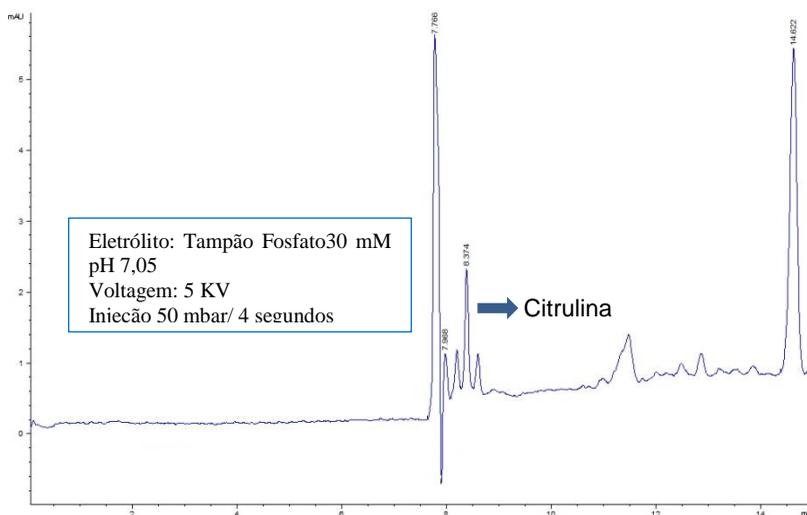
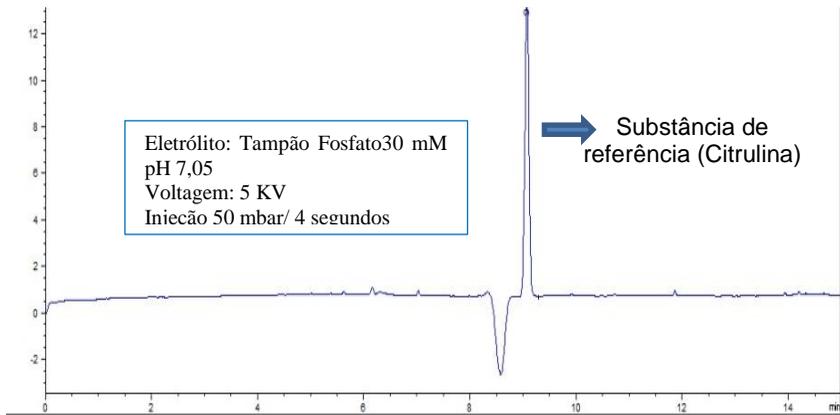


Figura 18 - Eletroferograma do padrão de citrulina analisada em 207nm.



Com a obtenção desses eletroferogramas, os quais demonstraram serem promissores, decidiu-se iniciar o processo de validação.

### 5.3.1 Validação dos parâmetros analíticos por EC

A validação dessa metodologia seguiu os parâmetros citados anteriormente em CLAE, fazendo uso dos guias ICH (2005), FDA (2001) e ANVISA (2012).

#### 5.3.1.1 Seletividade

A seletividade foi determinada por meio da co-injeção da amostra com o padrão de referência, sendo realizado com seis amostras de diferentes pacientes e com o padrão interno metilparabeno. A partir desse ensaio foi possível observar um aumento das áreas dos picos correspondentes ao composto de referência, indicando que o método possui especificidade para a substância de interesse.

#### 5.3.1.2 Precisão

Como pode ser observado na Tabela 12, os valores obtidos não extrapolaram os 15% aceitáveis para matriz biológica como disposto na

RDC 27 da ANVISA (2012). Dessa forma, o método desenvolvido é considerado preciso.

Tabela 12- Análise de repetibilidade e precisão intermediária

	Repetibilidade*			Precisão intermediária**		
	25	50	100	25	50	100
Citrulina	2,5	3,0	0,5	0,77	2,07	0,4

\*Valores expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

\*\*Valores expressos em CV (%).

### 5.3.1.3 Exatidão

Para o ensaio da exatidão foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a partir do ensaio de recuperação. Os resultados estão expressos na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise do percentual de recuperação

Concentrações $\mu\text{g.mL}^{-1}$	%Recuperação
25	93,96
50	94,38
75	98,96
Média	95,77

O método apresentou ser bastante exato com uma média de recuperação de 95,77%, mesmo trabalhando com uma amostra não derivatizada.

### 5.3.1.4 Faixa de Linearidade

Para a determinação da faixa de linearidade foram construídas curvas de calibração com seis pontos. Os resultados podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros avaliados na linearidade

	Faixa linear ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	$r^2$
Citrulina	12,5 - 150	0,996

$r^2$  = coeficiente de determinação.

Os valores encontrados demonstram que o método é linear, uma vez que os valores encontrados são proporcionais às concentrações testadas.

### 5.3.1.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que o método é sensível, apresentando valores inferiores aos encontrados por CLAE. O limite de detecção observado é levemente superior ao encontrado por Tuma e colaboradores (2006), o que pode ser justificado pela influência do procedimento de derivatização da amostra.

Tabela 15 - Limite de detecção e quantificação

	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Citrulina	2,25	6,82

## 6 CONCLUSÃO

- A retirada de proteínas nas amostras demonstrou ser um processo crucial e limitante para o desenvolvimento metodológico.
- O procedimento que apresentou melhor eficiência para a retirada de proteínas da amostra foi o que utilizou o solvente orgânico metanol na proporção 1:4 (v/v)
- Foi possível desenvolver metodologias por CLAE e EC sem utilizar agentes para derivatizar as amostras.
- Ambos os métodos atenderam aos parâmetros de precisão, exatidão, seletividade, faixa de linearidade e aos limites de detecção e quantificação estabelecidos pelo ICH, FDA e a resolução publicada pela ANVISA.
- A temperatura e a voltagem mostraram ter um papel importante no desenvolvimento do método por EC.
- O método desenvolvido por EC apresentou bons resultados, demonstrando ser uma metodologia promissora e com possibilidade de ser implementada futuramente em exames de rotina para acompanhar os níveis de citrulina de pacientes, como os que são submetidos a procedimentos cirúrgicos intestinais.



## REFERÊNCIAS

- ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antiproteínas citrulinadas ea artrite reumatóide. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 180-187, 2007.
- ALONSO, J. B.; NIETO, J. S.; LÓPEZ, V. N.; GÁLVEZ, A. B.; VICIOSO, I.; GALLEGO, B. C.; PÉREZ, P. O.; SALINAS, C. S. Citrulina plasmática como marcador de perda de masa enterocitaria en la enfermedad celíaca en la infancia. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 4, p. 807-813, 2011.
- AMIOT, A.; BERNARD, M.; CORCOS, O.; YVES, P.; JOLY, F. Determinants of home parenteral nutrition dependence and survival of 268 patients with non-malignant short bowel syndrome. **Clinical nutrition**, 2013.
- ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. ANVISA. Diário Oficial da União Poder Executivo: 27 de maio. Resolução nº 899 2012.
- ASGEIRSSON, T.; ZHANG, S.; NUNOO, R.; MASCARENAS, C.; DUJOVNY, N.; LUCHTEFELD, M.; CAVEY, G. S.; SENAGORE, A. Citrulline: A potential immunomodulator in sepsis. **Surgery**, v. 150, n. 4, p. 744-751, 2011.
- ATTA, A. M.; CARVALHO, E. M.; JERÔNIMO, S. M. B.; SOUSA ATTA, M. L. B. Serum markers of rheumatoid arthritis in visceral leishmaniasis: Rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. **Journal of Autoimmunity**, v. 28, n. 1, p. 55-58, 2007.
- BAHIA, L.; AGUIAR, L. G. D.; VILLELA, N. R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. The endothelium in the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.
- BAHRI, S.; ZERROUK, N.; AUSSEL, C.; MOINARD, C.; CRENN, P.; CURIS, E.; CHAUMEIL, J.-C.; CYNOBER, L.; SFAR, S. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. **Nutrition**, 2012.
- BAILLY-BOTUHA, C.; COLOMB, V.; THIOULOUSE, E.; BERTHE, M.-C.; GARCETTE, K.; DUBERN, B.; GOULET, O.; COUDERC, R.; GIRARDET, J.-P. Plasma citrulline concentration reflects enterocyte mass

in children with short bowel syndrome. **Pediatric research**, v. 65, p. 559-563, 2009.

BARRACHINA, M.; PANES, J.; ESPLUGUES, J. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 1, p. 31-48, 2001.

BARTELS, E. M.; RIBEL-MADSEN, S. Cytokine measurements and possible interference from heterophilic antibodies - problems and solutions experienced with rheumatoid factor. **Methods**, v. 61, n. 1, p. 18-22, 2013.

BARTOLONI, E.; ALUNNO, A.; BISTONI, O.; BIZZARO, N.; MIGLIORINI, P.; MOROZZI, G.; DORIA, A.; MATHIEU, A.; LOTZNIKER, M.; ALLEGRI, F.; RICCIERI, V.; ALPINI, C.; GABRIELLI, A.; TAMPOIA, M.; GERLI, R. Diagnostic value of anti-mutated citrullinated vimentin in comparison to anti-cyclic citrullinated peptide and anti-viral citrullinated peptide 2 antibodies in rheumatoid arthritis: An Italian multicentric study and review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 11, p. 815-820, 2012.

BEALE, R.; REINHART, K.; BRUNKHORST, F.; DOBB, G.; LEVY, M.; MARTIN, G.; MARTIN, C.; RAMSEY, G.; SILVA, E.; VALLET, B. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222-232, 2009.

BÉRTOLO, M. B.; BRENOL, C. V.; SCHAINBERG, C. G.; NEUBARTH, F.; LIMA, F.; LAURINDO, I. M.; SILVEIRA, I. G.; PEREIRA, I. A.; LOURES, M. A. R.; AZEVEDO, M. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 151-9, 2007.

BLOCK, D. R.; ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. Body fluid analysis: Clinical utility and applicability of published studies to guide interpretation of today's laboratory testing in serous fluids\*. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 50, n. 4-5, p. 107-124, 2013.

BOELENS, P. G.; VAN LEEUWEN, P. A.; DEJONG, C. H.; DEUTZ, N. E. Intestinal renal metabolism of L-citrulline and L-arginine following enteral or parenteral infusion of L-alanyl-L-[2, 15N] glutamine or L-[2, 15N] glutamine in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 4, p. G679-G685, 2005.

BOUBY, N.; HASSLER, C.; PARVY, P.; BANKIR, L. Renal synthesis of arginine in chronic renal failure: in vivo and in vitro studies in rats with 5/6 nephrectomy. **Kidney international**, v. 44, n. 4, p. 676-683, 1993.

BOULAT, O.; MCLAREN, D. G.; ARRIAGA, E. A.; CHEN, D. D. Y. Separation of free amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence: potential for emergency diagnosis of inborn errors of metabolism. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 754, n. 1, p. 217-228, 2001.

BOURI, M.; SALGHI, R.; ZOUGAGH, M.; RÍOS, A. Capillary electrophoresis coupled to evaporative light scattering detection for direct determination of underivatized amino acids: Application to tea samples using carboxyiled single-walled carbon nanotubes for sample preparation. **Electrophoresis**, v. 34, n. 18, p. 2623-2631, 2013.

BOWLES, T. L.; KIM, R.; GALANTE, J.; PARSONS, C. M.; VIRUDACHALAM, S.; KUNG, H. J.; BOLD, R. J. Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. **International journal of cancer**, v. 123, n. 8, p. 1950-1955, 2008.

BRYK, J.; OCHOA, J. B.; CORREIA, M. I. T.; MUNERA-SEELEY, V.; POPOVIC, P. J. Effect of citrulline and glutamine on nitric oxide production in RAW 264.7 cells in an arginine-depleted environment. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 377-383, 2008.

CAPLIN, B.; LEIPER, J. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: Markers, mediators, and regulators? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 6, p. 1343-1353, 2012.

CARAMORI, P. R. A.; ZAGO, A. J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 75, n. 2, 2000.

CARLBERG, M. Assay of neuronal nitric oxide synthase by HPLC determination of citrulline. **Journal of neuroscience methods**, v. 52, n. 2, p. 165-167, 1994.

CEBALLOS, I.; CHAUVEAU, P.; GUERIN, V.; BARDET, J.; PARVY, P.; KAMOUN, P.; JUNGERS, P. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 188, n. 2, p. 101-108, 1990.

CENA, J.; CHOW, A. K.; SCHULZ, R. Nitric oxide, peroxynitrite and matrix metalloproteinases: Insight into the pathogenesis of sepsis. In: BRUNO, T. e BARRY, T. (Ed.). **Advances in Experimental Biology**: Elsevier, v. Volume 1, 2007. p.367-396.

CENDORO GLO NETO, M.; YOUNES-IBRAHIM, M.; SANTOS, O. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento da Insuficiência Renal Aguda. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2001.

CENTENO, A. G. Anticuerpos antipeptídicos citrulinados en la artritis reumatoide. **Revista Española de Reumatología**, v. 31, n. 4, p. 165-8, 2004.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão; Nitric oxide: review. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHEN, H.; XU, Y.; IP, M. Determination of Amino Acids in Urine by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 20, n. 15, p. 2475-2493, 1997.

CHEUNG, C.; COHEN, N.; RAIJMAN, L. Channeling of urea cycle intermediates in situ in permeabilized hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 7, p. 4038-4044, 1989.

CIANCIARULLO, M. A.; COSTA, I. D. C.; CECCON, M. E. J.; KREBS, V. L. J. Novos x antigos marcadores de infecção no diagnóstico de sepsis neonatal: visão crítica. **Pediatria (São Paulo)**, v. 30, n. 2, p. 107-17, 2008.

COENEN, D.; VERSCHUEREN, P.; WESTHOVENS, R.; BOSSUYT, X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Clinical chemistry**, v. 53, n. 3, p. 498-504, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1. Campinas Unicamp, 2006.

COLLINS, J. K.; WU, G.; PERKINS-VEAZIE, P.; SPEARS, K.; CLAYPOOL, P. L.; BAKER, R. A.; CLEVIDENCE, B. A. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. **Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 261-266, 2007.

COSTA, I. F. D. O.; CARVALHO, C. M. R. G. D.; MELO, M. T. S. M.; FREITAS, B. D. J. Terapia nutricional e uso de glutamina, citrulina, arginina e probióticos na Síndrome do Intestino Curto; Nutritional therapy and the Use of glutamine, citrulline, arginine and probiotics in Short Bowel Syndrome. **UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saude**, v. 14, n. 1, 2012.

CRENN, P.; COUDRAY-LUCAS‡, C.; THUILLIER, F.; CYNOBER, L.; MESSING\*, B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1496-1505, 2000.

CRENN, P.; CYNOBER, L. Effect of intestinal resections on arginine metabolism: practical implications for nutrition support. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, n. 1, p. 65-69, 2010.

CRENN, P.; MATUCHANSKY, C.; MESSING, B. Clinical and biochemical modelization of postsurgicalintestinal failure in human adults. **Clinical nutrition**, v. 16, n. 3, p. 133-135, 1997.

CRENN, P.; MESSING, B.; CYNOBER, L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. **Clinical nutrition**, v. 27, n. 3, p. 328-339, 2008.

CRENN, P.; NEVEUX, N.; CHEVRET, S.; JAFFRAY, P.; CYNOBER, L.; MELCHIOR, J.-C.; ANNANE, D. Plasma l-citrulline concentrations and its relationship with inflammation at the onset of septic shock: A pilot study. **Journal of Critical Care**, n. 0, 2013.

CRENN, P.; VAHEDI, K.; LAVERGNE-SLOVE, A.; CYNOBER, L.; MATUCHANSKY, C.; MESSING, B. Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1210-1219, 2003.

CUNHA, S.; ASSUMPCÃO, E. P.; FERREIRA, E. N.; MOTTA, J. S.; SOUZA, R. M.; SILVA, H. C.; SILVA, W. O.; DAMASCO, P. V.; PEREZ, M. C.; COSCARELLI, P. G. Protocolo de tratamento da sepse grave-HUPE contra a sepse. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 12, n. 3, 2013.

CURIS, E.; CRENN, P.; CYNOBER, L. Citrulline and the gut. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 5, p. 620-626, 2007.

CURIS, E.; NICOLIS, I.; MOINARD, C.; OSOWSKA, S.; ZERROUK, N.; BÉNAZETH, S.; CYNOBER, L. Almost all about citrulline in mammals. **Amino Acids**, v. 29, n. 3, p. 177-205, 2005.

CYNOBER, L. A. **Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition**. CRC Press, 2013. ISBN 0203010264.

DE CEULENEER, M.; VAN STEENDAM, K.; DHAENENS, M.; DEFORCE, D. In vivo relevance of citrullinated proteins and the challenges in their detection. **Proteomics**, v. 12, n. 6, p. 752-760, 2012.

DE MATOS, G. F. J.; VICTORINO, J. A. Critérios para o Diagnóstico de Sepses, Sepses Grave e Choque Séptico. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, p. 102, 2004.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. D. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, 2011.

DEIGHTON, C.; O'MAHONY, R.; TOSH, J.; TURNER, C.; RUDOLF, M. Guidelines: Management of rheumatoid arthritis: summary of NICE guidance. **BMJ: British Medical Journal**, v. 338, 2009.

DEIRDRE, A. K. Intestinal Failure—Associated Liver Disease: What Do We Know Today? **Gastroenterology**, v. 130, n. 2, Supplement, p. S70-S77, 2006.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D.; GERLACH, H.; OPAL, S. M.; SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, I. S.; JAESCHKE, R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, 2013.

DEMACKER, P. N. M.; BEIJERS, A. M.; VAN DAAL, H.; DONNELLY, J. P.; BLIJLEVENS, N. M. A.; VAN DEN OUWELAND, J. M. W. Plasma citrulline measurement using UPLC tandem mass-spectrometry to determine small intestinal enterocyte pathology. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 4, p. 387-392, 2009.

DIONIGI, P.; ALESSIANI, M.; FERRAZI, A. Irreversible intestinal failure, nutrition support, and small bowel transplantation. **Nutrition**, v. 17, n. 9, p. 747-750, 2001.

DRUCKER, D. J.; ERLICH, P.; ASA, S. L.; BRUBAKER, P. L. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 15, p. 7911-7916, 1996. ISSN 0027-8424.

DUSAD, A.; DURYEE, M. J.; SHAW, A. T.; KLASSEN, L. W.; ANDERSON, D. R.; WANG, D.; REN, K.; GRAVALLESE, E. M.; O'DELL, J. R.; MIKULS, T. R.; THIELE, G. M. Induction of bone loss in DBA/1J mice immunized with citrullinated autologous mouse type II collagen in the absence of adjuvant. **Immunologic Research**, p. 1-10, 2013.

EL-KIRSH, A. A. A.; EL-WAHAB, A.; FATHY, H. M.; SAYED, A.-E.; FAHMY, H. The effect of L-arginine or L-citrulline supplementation on biochemical parameters and the vascular aortic wall in high-fat and high-cholesterol-fed rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 5, p. 414-428, 2011.

ELFAKIR, C. 1.2.1. HPLC of amino acids without derivatization. In: IBOLYA, M.-P. (Ed.). **Journal of Chromatography Library**: Elsevier, v. Volume 70, 2005. p.120-136.

ELKAYAM, O.; SEGAL, R.; LIDGI, M.; CASPI, D. Positive anti-cyclic citrullinated proteins and rheumatoid factor during active lung tuberculosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 8, p. 1110-1112, 2006.

ENTERAL, S. B. D. N. P. E. **Terapia Nutricional na Síndrome do Intestino Curto-Insuficiência/Falência Intestinal**. MCG, R. R.; BORGES, A., *et al.* São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2011.

ESCOBALES, N.; RIVERA-CORREA, M.; ALTIERI, P.; RODRIGUEZ, J. Relationship between NO synthesis, arginine transport, and intracellular arginine levels in vascular smooth muscle cells. **Amino Acids**, v. 19, n. 2, p. 451-468, 2000.

FARID, S. S.; AZIZI, G.; MIRSHAFIEY, A. Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 16, n. 4, p. 379-386, 2013.

FDA, C. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV)**, 2001.

FEKKES, D.; VAN DALEN, A.; EDELMAN, M.; VOSKUILEN, A. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with *o*-phthalaldehyde. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 669, n. 2, p. 177-186, 1995.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FLYNN, N.; MEININGER, C.; HAYNES, T.; WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 9, p. 427-438, 2002.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Critical care clinics**, v. 25, n. 1, p. 83-101, 2009.

GEORGE, A.; GOW, A. Nitric Oxide Biochemistry: Pathophysiology of Nitric Oxide-Mediated Protein Modifications. In: (Ed.). **Oxidative Neural Injury**: Springer, 2009. p.29-44.

GHESHLAGHI, R.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; DOUGLAS, P. L. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. **Analytical Biochemistry**, v. 383, n. 1, p. 93-102, 2008.

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; VILLEGAS-PORTERO, M. J.; BERNAL-DAZA, V. Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 1, p. 221-230, 2005.

GONZAGA, S. D. F. R.; RIECHELMANN, R.; KALIKS, R.; DEL GIGLIO, A. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de

mama em um hospital público. **Revista Associação Medica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 72-6, 2008.

GOULET, O.; RUEMMELE, F.; LACAILLE, F.; COLOMB, V. Irreversible intestinal failure. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 38, n. 3, p. 250-269, 2004.

HALLEMEESCH, M.; LAMERS, W.; DEUTZ, N. Reduced arginine availability and nitric oxide production. **Clinical nutrition**, v. 21, n. 4, p. 273-279, 2002.

HARDER, U.; KOLETZKO, B.; PEISSNER, W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 7-8, p. 495-504, 2011.

HAYNES, W. M. **CRC handbook of chemistry and physics**. CRC press, 2012. ISBN 1439880492.

HECKER, M.; SESSA, W. C.; HARRIS, H. J.; ANGGÅRD, E.; VANE, J. R. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8612-8616, 1990.

HERZFELD, A.; RAPER, S. Enzymes of orithine metabolism in adult developing rat intestine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 428, n. 3, p. 600-610, 1976.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473-476, 1987.

HIDALGO CALLEJA, C.; MONTILLA MORALES, C.; GÓMEZ CASTAÑO, S.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, M. D.; DEL PINO MONTES, J. Protocol diagnosis of a patient with rheumatoid factor positive. **Protocolo diagnóstico de un paciente con factor reumatoide positivo**, v. 11, n. 34, p. 2116-2119, 2013.

HOFFORD, J. M.; MILAKOFSKY, L.; PELL, S.; VOGEL, W. A profile of amino acid and catecholamine levels during endotoxin-induced acute lung injury in sheep: Searching for potential markers of the acute respiratory distress syndrome. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 128, n. 6, p. 545-551, 1996.

HOLLENBERG, S. M.; AHRENS, T. S.; ANNANE, D.; ASTIZ, M. E.; CHALFIN, D. B.; DASTA, J. F.; HEARD, S. O.; MARTIN, C.; NAPOLITANO, L. M.; SUSLA, G. M. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Critical care medicine**, v. 32, n. 9, p. 1928-1948, 2004.

HONSOVA, E.; LODEREROVA, A.; BALAZ, P.; OLIVERIUS, M. Plasma citrulline levels and acute cellular rejection early after small bowel transplantation in pigs. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 5, p. 215-222, 2009.

ICH, G. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). **IFPMA: Geneva**, 2005.

IGARASHI, K.; SUGIYAMA, Y.; KASUYA, F.; INOUE, H.; MATOBA, R.; CASTAGNOLI, N. Analysis of citrulline in rat brain tissue after perfusion with haloperidol by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 746, n. 1, p. 33-40, 2000.

ILISZ, I.; ARANYI, A.; PATAJ, Z.; PÉTER, A. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, n. 0, p. 28-41, 2012.

JAISSON, S.; GORISSE, L.; PIETREMENT, C.; GILLERY, P. Quantification of plasma homocitrulline using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 4, p. 1635-1641, 2012.

JAYAPRAKASHA, G. K.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; PATIL, B. S. Rapid HPLC-UV method for quantification of l-citrulline in watermelon and its potential role on smooth muscle relaxation markers. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 240-248, 2011.

JEPPESEN, P. Clinical significance of GLP-2 in short-bowel syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3721-3724, 2003.

JIANFENG, G.; WEIMING, Z.; NING, L.; FANGNAN, L.; LI, T.; NAN, L.; JIESHOU, L. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. **Journal of surgical research**, v. 127, n. 2, p. 177-182, 2005.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 317-320, 2004.

JÚNIOR, J.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; DIAS, M. D. A.; KOTERBA10, E. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

KANG, X.; XIAO, J.; HUANG, X.; GU, Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, n. 1, p. 352-356, 2006.

KAO, C.; BANDI, V.; GUNTUPALLI, K.; WU, M.; CASTILLO, L.; JAHOR, F. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. **Clinical Science**, v. 117, p. 23-30, 2009.

KAORE, S. N.; AMANE, H. S.; KAORE, N. M. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 35-50, 2013.

KHWAJA, A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. **Nephron Clinical Practice**, v. 120, n. 4, p. c179-c184, 2012.

KOHLI, R.; MEININGER, C. J.; HAYNES, T. E.; YAN, W.; SELF, J. T.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 600-608, 2004.

KOSHIISHI, I.; KOBORI, Y.; IMANARI, T. Determination of citrulline and homocitrulline by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 532, p. 37-43, 1990.

LASCHI, S.; TOMBELLI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M.; MARRAZZA, G. New Affinity Biosensors as Diagnostic Tools for Tumour Marker Analysis. In: (Ed.). **Sensors**: Springer, 2014. p.19-23.

LAU, T.; OWEN, W.; YU, Y. M.; NOVISKI, N.; LYONS, J.; ZURAKOWSKI, D.; TSAY, R.; AJAMI, A.; YOUNG, V. R.; CASTILLO, L. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 9, p. 1217-1225, 2000.

LAURINDO, I.; XIMENES, A.; LIMA, F.; PINHEIRO, G.; BATISTELLA, L.; BERTOLO, M.; ALENCAR, P.; XAVIER, R.; GIORGI, R.; CICONELLI, R. Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435-442, 2004.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903-911, 2001.

LEE, E. H.; KO, J. S.; SEO, J. K. Correlations of plasma citrulline levels with clinical and endoscopic score and blood markers according to small bowel involvement in pediatric crohn disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 57, n. 5, p. 570-575, 2013.

LEE, Y.-H.; LIN, T.-I. Capillary electrophoretic determination of amino acids with indirect absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 680, n. 1, p. 287-297, 1994.

LEVEY, A. S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **The Lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-180, 2012. Acesso em: 2012/1/20/.

LI, T.; BAO, J.; YIN, J.; XU, H. J. The specificity of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis from a large cohort study in the Chinese. **Zhonghua nei ke za zhi [Chinese journal of internal medicine]**, v. 50, n. 2, p. 99-101, 2011.

LIGTHART-MELIS, G. C.; VAN DE POLL, M. C.; BOELENS, P. G.; DEJONG, C. H.; DEUTZ, N. E.; VAN LEEUWEN, P. A. Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1282-1289, 2008.

LIMA, I.; SANTIAGO, M. Antibodies against cyclic citrullinated peptides in infectious diseases—a systematic review. **Clinical rheumatology**, v. 29, n. 12, p. 1345-1351, 2010.

LINGEMAN, H. **Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography**. CRC Press, 1990.

LÓPEZ, R. V.; MORENO, A. A.; BOLUDA, E. R.; NODAL, E. M.-O.; MACÍAS, A. H.; BOZANO, G. P.; SANTAMARIA, M. L.; LARRUCEA, J. T. Valor de la citrulina plasmática como biomarcador de función intestinal en el síndrome de intestino corto y en el trasplante intestinal. **Anales de Pediatría**, 2012.

LORENZI, T. F. **Manual de hematología: propedéutica e clínica**. Medsi, 1992.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P. K. J.; DEUTZ, N. E. P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, 2010.

LUIKING, Y. C.; HALLEMEESCH, M. M.; VAN DE POLL, M. C.; DEJONG, C. H.; DE JONGE, W. J.; LAMERS, W. H.; DEUTZ, N. E. Reduced citrulline availability by OTC deficiency in mice is related to reduced nitric oxide production. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 295, n. 6, p. E1315-E1322, 2008.

LUIKING, Y. C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N. E. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 1, p. 142-152, 2009.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MAO, H.-M.; CHEN, B.-G.; WANG, W.-M.; ZHUANG, P.; ZONG, M.; XU, Z.-G. Simultaneous analysis of citrulline and arginine in serum and tissue. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 2, p. 291-295, 2011.

MAO, H.-M.; WEI, W.; XIONG, W.-J.; LU, Y.; CHEN, B.-G.; LIU, Z. Simultaneous determination of l-citrulline and l-arginine in plasma by high performance liquid chromatography. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13-14, p. 1141-1147, 2010.

MCKENZIE, J. A. M.; WATSON, C. J.; ROSTAND, R. D.; GERMAN, I.; WITOWSKI, S. R.; KENNEDY, R. T. Automated capillary liquid chromatography for simultaneous determination of neuroactive amines and amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 962, n. 1-2, p. 105-115, 2002.

MESSING, B.; CRENN, P. Facteurs pronostiques cliniques et biologiques de l'insuffisance intestinale chronique. **Nutrition clinique et métabolisme**, v. 14, n. 4, p. 280-288, 2000.

MILLER, R. T.; MARTÁSEK, P.; ROMAN, L. J.; NISHIMURA, J. S.; MASTERS, B. S. S. Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. **Biochemistry**, v. 36, n. 49, p. 15277-15284, 1997.

MOINARD, C.; CYNOBER, L. Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1621S-1625S, 2007.

MOLNÁR-PERL, I. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 291-309, 2003.

MORRIS JR, S. M. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 87-105, 2002.

NELSON, K. A. Y. Y.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger Princípios de bioquímica**. Sarvier, 2002.

NETO, C.; BARRETO, A. R. F.; MUGLIA, V. F.; ELIAS JUNIOR, J.; BELLUCCI, Â. D.; MARCHINI, J. S.; CUNHA, S. F. D. C. D. Barium follow through in the assessment and follow-up of adult patients with short bowel syndrome. **Radiologia Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 188-191, 2011.

NOORDALLY, S. O.; SOHAWON, S.; SEMLALI, H.; MICHELY, D.; DEVRIENDT, J.; GOTTIGNIES, P. Is there a correlation between circulating levels of citrulline and intestinal dysfunction in the critically ill? **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 4, p. 527-532, 2012.

NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M.; PISI, P. C.; RORIZ-FILHO, J. S. Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 43, n. 3, 2010.

O'KEEFE, S. J.; BUCHMAN, A. L.; FISHBEIN, T. M.; JEEJEEBHOY, K. N.; JEPPESEN, P. B.; SHAFFER, J. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 6-10, 2006.

OPAL, S. M. The evolution of the understanding of sepsis, infection, and the host response: a brief history. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 1-27, 2011.

OREA-TEJEDA, A.; OROZCO-GUTIÉRREZ, J. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, L.; KEIRNS-DAVIES, C.; MONTANO-HERNÁNDEZ, P.; VÁZQUEZ-DÍAZ, O.; VALDESPINO-TREJO, A.; INFANTE, O.; MARTÍNEZ-MEMIJE, R. The effect of L-arginine and citrulline on endothelial function in patients in heart failure with preserved ejection fraction. **Cardiology Journal**, v. 17, n. 5, p. 464-470, 2010.

OSTROWSKI, S. R.; BERG, R. M. G.; WINDELØV, N. A.; MEYER, M. A. S.; PLOVSING, R. R.; MØLLER, K.; JOHANSSON, P. I. Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis: A prospective study. **Journal of Critical Care**, v. 28, n. 5, p. 586-596, 2013.

PAPADIA, C.; KELLY, P.; CAINI, S.; ROBERTO CORAZZA, G.; SHAWA, T.; FRANZÈ, A.; FORBES, A.; DI SABATINO, A. Plasma citrulline as a quantitative biomarker of HIV-associated villous atrophy in a tropical enteropathy population. **Clinical nutrition**, v. 29, n. 6, p. 795-800, 2010.

PATCHETT, M. L.; MONK, C. R.; DANIEL, R. M.; MORGAN, H. W. Determination of agmatine, arginine, citrulline and ornithine by reversed-phase liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 425, n. 0, p. 269-276, 1988.

PÉREZ-NERI, I.; CASTRO, E.; MONTES, S.; BOLL, M.-C.; BARGES-COLL, J.; SOTO-HERNÁNDEZ, J. L.; RÍOS, C. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 250-256, 2007.

PITON, G.; MANZON, C.; MONNET, E.; CYPRIANI, B.; BARBOT, O.; NAVELLOU, J.-C.; CARBONNEL, F.; CAPELLIER, G. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients. **Intensive care medicine**, v. 36, n. 4, p. 702-706, 2010.

POINSOT, V.; ONG-MEANG, V.; GAVARD, P.; COUDERC, F. Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2011-2013. **Electrophoresis**, v. 35, n. 1, p. 50-68, 2014.

PONT, L.; BENAVENTE, F.; BARBOSA, J.; SANZ-NEBOT, V. An update for human blood plasma pretreatment for optimized recovery of low-molecular-mass peptides prior to CE-MS and SPE-CE-MS. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 24, p. 3896-3902, 2013.

QUEIROZ, S. C. D. N.; JARDIM, I. C. S. Eletroforese Capilar. **Chemkey**, v. 1, p. 1-9 2001.

RAGHAVAN, S. A.; DIKSHIT, M. L-citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. **European journal of pharmacology**, v. 431, n. 1, p. 61-69, 2001.

RANDALL, T. S. Kidney modeling and systems physiology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 172-190, 2009.

RHOADS, J. M.; PLUNKETT, E.; GALANKO, J.; LICHTMAN, S.; TAYLOR, L.; MAYNOR, A.; WEINER, T.; FREEMAN, K.; GUARISCO, J. L.; WU, G. Y. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 146, n. 4, p. 542-547, 2005.

RIBEIRO, R.; OLIVEIRA, G.; RIBEIRO, D. F.; BERTOLIN, D. C.; CESARINO, C. B.; LIMA, L.; OLIVEIRA, S. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 21, p. 207-11, 2008.

RIMANDO, A. M.; PERKINS-VEAZIE, P. M. Determination of citrulline in watermelon rind. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, n. 1, p. 196-200, 2005.

ROCHA, R.; BORGES, A.; CAMPOS, A.; BUZZINI, R. Terapia Nutricional na Síndrome do Intestino Curto-Insuficiência/Falência Intestinal. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2011.

ROKKAS, T.; VAJA, S.; MURPHY, G. M.; DOWLING, R. H. Postheparin plasma diamine oxidase in health and intestinal disease. **Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1493-1501, 1990.

SANCHEZ-PERNAUTE, O.; FILKOVA, M.; GABUCIO, A.; KLEIN, M.; MACIEJEWSKA-RODRIGUES, H.; OSPILT, C.; BRENTANO, F.;

MICHEL, B. A.; GAY, R. E.; HERRERO-BEAUMONT, G.; GAY, S.; NEIDHART, M.; JUENGEL, A. Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 8, p. 1400-1406, 2013.

SASE, A.; DAHANAYAKA, S.; HÖGER, H.; WU, G.; LUBEC, G. Changes of hippocampal beta-alanine and citrulline levels are paralleling early and late phase of retrieval in the Morris Water Maze. **Behavioural brain research**, v. 249, p. 104-108, 2013.

SCHLATZER, D. M.; DAZARD, J. E.; EWING, R. M.; ILCHENKO, S.; TOMCHEKO, S. E.; EID, S.; HO, V.; YANIK, G.; CHANCE, M. R.; COOKE, K. R. Human biomarker discovery and predictive models for disease progression for idiopathic pneumonia syndrome following allogeneic stem cell transplantation. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 6, 2012.

SESSA, W. C.; HECKER, M.; MITCHELL, J. A.; VANE, J. R. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8607-8611, 1990.

SESSO, R.; LOPES, A.; THOM, F.; LUGON, J.; WATANABE, Y.; SANTOS, D. Diálise crônica no Brasil-relatório do censo brasileiro de diálise, 2011. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 272-277, 2012.

SHIMBO, K.; KUBO, S.; HARADA, Y.; OONUKI, T.; YOKOKURA, T.; YOSHIDA, H.; AMAO, M.; NAKAMURA, M.; KAGEYAMA, N.; YAMAZAKI, J. Automated precolumn derivatization system for analyzing physiological amino acids by liquid chromatography/mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 7, p. 683-691, 2010.

SILVA, C. R.; JARDIM, I.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas Fases Estacionarias a Base de Silica para Cromatografia Liquida de Alta Eficiencia. **Química nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVA, J. A. F. D.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R. R.; PEREZ, M. C. A.; MENDONÇA, E. G. D.; OLIVEIRA, M. G. D. A.; GELLER, M. Sepsis: an update. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SOARES, L. V. Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. In: (Ed.). Barueri: Manole, 2006. p.266-278.

STEELMAN, S. M.; JOHNSON, P.; JACKSON, A.; SCHULZE, J.; CHOWDHARY, B. P. Serum metabolomics identifies citrulline as a predictor of adverse outcomes in an equine model of gut-derived sepsis. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 10, p. 339-347, 2014.

STENVINKEL, P.; JOHNSON, R. J. Kidney Biomimicry—A Rediscovered Scientific Field That Could Provide Hope to Patients with Kidney Disease. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 8, p. 584-590, 2013.

SUZUKI, A.; YAMADA, R.; YAMAMOTO, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1108, n. 1, p. 323-339, 2007.

SZARKA, E.; BABOS, F.; MAGYAR, A.; HUBER, K.; SZITTNER, Z.; PAPP, K.; PRECHL, J.; POZSGAY, J.; NEER, Z.; ÁDORI, M.; NAGY, G.; ROJKOVICH, B.; GÁTI, T.; KELEMEN, J.; BAKA, Z.; BRÓZIK, M.; PAZÁR, B.; POÓR, G.; HUDECZ, F.; SÁRMAY, G. Recognition of new citrulline-containing peptide epitopes by autoantibodies produced in vivo and in vitro by B cells of rheumatoid arthritis patients. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 181-191, 2014.

TANG, W. H. W.; SHRESTHA, K.; WANG, Z.; BOROWSKI, A. G.; TROUGHTON, R. W.; KLEIN, A. L.; HAZEN, S. L. Protein Carbamylation in Chronic Systolic Heart Failure: Relationship With Renal Impairment and Adverse Long-Term Outcomes. **Journal of Cardiac Failure**, v. 19, n. 4, p. 219-224, 2013.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TŮMA, P.; SAMCOVÁ, E.; ANDĚLOVÁ, K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of Chromatography B**, v. 839, n. 1, p. 12-18, 2006.

TŮMA, P.; ŠTULÍK, K. Monitoring of Arrays of Amino Acids in Clinical Samples Using Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection. In: (Ed.). **Clinical Applications of Capillary Electrophoresis**: Springer, 2013. p.13-23.

VAN BOEKEL, M.; VOSSENAAR, E. R.; VAN DEN HOOGEN, F.; VAN VENROOIJ, W. J. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. **Arthritis research**, v. 4, n. 2, p. 87-93, 2002.

VAN DE POLL, M. C.; LIGTHART-MELIS, G. C.; BOELENS, P. G.; DEUTZ, N. E.; VAN LEEUWEN, P. A.; DEJONG, C. H. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. **The Journal of physiology**, v. 581, n. 2, p. 819-827, 2007.

VAN EIJK, H. M.; ROOYAKKERS, D. R.; DEUTZ, N. E. Rapid routine determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography with a 2–3  $\mu\text{m}$  Spherisorb ODS II column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 620, n. 1, p. 143-148, 1993.

VAN EIJK, H. M. H.; WIJNANDS, K. A. P.; BESSEMS, B. A. F. M.; OLDE DAMINK, S. W.; DEJONG, C. H. C.; POEZE, M. High sensitivity measurement of amino acid isotope enrichment using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 905, n. 0, p. 31-36, 2012.

VAN HAREN, F. Prognostic value of enterocyte injury in critically ill patients: no gut, no glory?\*. **Critical care medicine**, v. 41, n. 9, p. 2238-2239, 2013.

VAN WAARDENBURG, D. A.; DE BETUE, C. T.; LUIKING, Y. C.; ENGEL, M.; DEUTZ, N. E. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: strong relation with inflammation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1438-1444, 2007.

VARGAS, J. H. Short Bowel Syndrome/Intestinal Failure. **The Journal of Pediatrics**, v. 163, n. 5, p. 1243-1246, 2013.

VENKATARAMAN, R.; KELLUM, J. A. Sepsis: Update in the Management. **Advances in chronic kidney disease**, v. 20, n. 1, p. 6-13, 2013.

VOSSENAAR, E.; NIJENHUIS, S.; VAN HELSEN, M.; VAN DER HEIJDEN, A.; VAN DEN BERG, W.; VAN VENROOIJ, W.; JOOSTEN, L. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, n. Suppl 1, p. 30, 2003.

WAKABAYASHI, Y.; YAMADA, E.; YOSHIDA, T.; TAKAHASHI, N. Effect of intestinal resection and arginine-free diet on rat physiology. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 269, n. 2, p. G313-G318, 1995.

WANG, H.; MCNEIL, Y. R.; YEO, T. W.; ANSTEY, N. M. Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 940, n. 0, p. 53-58, 2013.

WARE, L. B.; MAGARIK, J. A.; WICKERSHAM, N.; CUNNINGHAM, G.; RICE, T. W.; CHRISTMAN, B. W.; WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R.; SUMMAR, M. L. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. **Critical Care**, v. 17, n. 1, p. R10, 2013.

WATERVAL, W. A. H.; SCHEIJEN, J. L. J. M.; ORTMANS-PLOEMEN, M. M. J. C.; HABETS-VAN DER POEL, C. D.; BIERAU, J. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1-2, p. 36-42, 2009.

WEBB, G. J.; BROOKE, R.; DE SILVA, A. N. Chronic radiation enteritis and malnutrition. **Journal of digestive diseases**, v. 14, n. 7, p. 350-357, 2013.

WESTPHAL, G. A.; VIEIRA, K. D.; ORZECOWSKI, R.; KAEFER, K. M.; ZACLIKEVIS, V. R.; MASTROENI, M. F. Análise da qualidade de vida após a alta hospitalar em sobreviventes de sepse grave e choque séptico. **Revista Panamericana Salud Pública**, v. 31, n. 6, p. 499-505, 2012.

WHO. World Health Organization. **World Health Statistic 2014**, 2014. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 05 junho de 2014.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 365-391, 2001.

WIJNANDS, K. A.; VINK, H.; BRIEDÉ, J. J.; VAN FAASSEN, E. E.; LAMERS, W. H.; BUURMAN, W. A.; POEZE, M. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37439, 2012.

WILEMAN, S. M.; MANN, G. E.; PEARSON, J. D.; BAYDOUN, A. R. Role of L-citrulline transport in nitric oxide synthesis in rat aortic smooth muscle cells activated with LPS and interferon- $\gamma$ . **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 179-185, 2003.

WINDMUELLER, H. G. Glutamine utilization by the small intestine. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 53, n. 201, p. 37, 1982.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 171, n. 2, p. 662-672, 1975.

WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009.

WU, G.; DAVIS, P. K.; FLYNN, N. E.; KNABE, D. A.; DAVIDSON, J. T. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 12, p. 2342-2349, 1997.

WU, G.; MORRIS, J. S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

YANG, D. H.; TU, C. C.; WANG, S. C.; WEI, C. C.; CHENG, Y. W. Circulating anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis and chronic obstructive pulmonary disease. **Rheumatology International**, p. 1-7, 2013.

ZAGO, A.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 264-70, 2006a.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264-e270, 2006b.

ZANON, F.; CAOVILO, J. J.; MICHEL, R. S.; CABEDA, E. V.; CERETTA, D. F.; LUCKEMEYER, G. D.; BELTRAME, C.; POSENATTO, N. Sepsis na unidade de terapia intensiva: etiologias, fatores prognósticos e mortalidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 2, p. 128-34, 2008.

ZHANG, W.-Z.; KAYE, D. M. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthalaldehyde precolumn derivatization. **Analytical Biochemistry**, v. 326, n. 1, p. 87-92, 2004.

ZOPPA, M.; GALLO, L.; ZACCHELLO, F.; GIORDANO, G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 831, n. 1-2, p. 267-273, 2006.

**ANEXO A – (Carta de Aprovação, Projeto N° 242/2012)****Carta de Aprovação****Resolução**

Comitê de Ética em Pesquisa, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) Ministério da Saúde analisou o projeto abaixo.

Folha de Rosto N° 486041

Projeto N° 242/2012

Pesquisador Responsável:

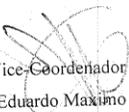
Dr. Cristiane Ritter

**Título:** "Avaliação do Desempenho de NRS2002, ASG e Citrulina Plasmática como Preditores de Desfechos Clínicos dos Pacientes de uma UTI em Criciúma, SC.."

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEP. Os membros do CEP não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Criciúma, 09 de Março de 2012

  
Coordenador do CEP  
Felipe Dal Pizzol

  
Vice-Coodenador do CEP  
Eduardo Maximo